

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/29, 1/19, 5/10, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/66042
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1999 (23.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04095		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, LT, LV, RO, RU, SI, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Juni 1999 (14.06.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 26 444.5 13. Juni 1998 (13.06.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FLÜGGE, Ulf-Ingo [DE/DE]; Pastoratsstrasse 1, D-50997 Köln (DE). WEBER, Andreas [DE/DE]; Euskirchener Strasse 32, D-50937 Köln (DE). FISCHER, Karsten [DE/DE]; Berrenrather Strasse 460, D-50354 Hürth-Efferen (DE). SERVAITES, Jerome [US/US]; 7816 Port Circle, Centerville, OH 45459 (US).			
(74) Anwalt: KÖSTER, Hajo; Jaeger und Köster, Pippinplatz 4a, D-82131 Gauting (DE).			

(54) Title: DNA SEQUENCES WHICH CODE A GLUCOSE-TRANSLOCATOR, PLASMIDS, BACTERIA, YEASTS AND PLANTS CONTAINING THIS TRANSLOCATOR

(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZEN KODIEREND EINEN GLUKOSE-TRANSLOKATOR, PLASMIDE, BAKTERIEN, HEFEN UND PFLANZEN ENTHALTEND DIESEN TRANSPORTER

(57) Abstract

The invention relates to DNA sequences from *Zea mays* (corn), *Solanum tuberosum* (potato) and *Spinacia oleracea* (spinach) which contain the coding region of a glucose-translocator. The introduction of said DNA sequences in a vegetable genome modifies the formation and transmission of carbon parent structures in transgenic plants, plasmids, yeasts and bacteria containing these DNA sequences. The invention also relates to transgenic plants in which modifications of the activity of the glucose-translocator and thus alterations in the carbon metabolism are provoked by introducing the DNA sequences. In addition, the invention relates to the use of the described sequences of the glucose translocator for identifying related translocators from other plants (angiosperms, gymnosperms, and algae) by hybridizing with lower stringency or by PCR techniques. The invention also relates to the use of the glucose-translocator as a "target" for herbicides.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen aus *Zea mays* (Mais), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Spinacia oleracea* (Spinat), die die Kodierregion eines Glukose-Translokators enthalten, deren Einführung in ein pflanzliches Genom die Bildung und Weiterleitung von Kohlenstoffgrundgerüsten in transgenen Pflanzen verändert, Plasmide, Hefen und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenzen, sowie transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung der DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität des Glukose-Translokators und somit Änderungen im Kohlenstoffstoffwechsel hervorgerufen werden. Weiterhin betrifft die Erfindung die Nutzung der beschriebenen Sequenzen des Glukose-Translokators zur Identifizierung verwandter Translokatoren aus anderen Pflanzen (Angiospermen, Gymnospermen, sowie Algen) durch Hybridisierung mit niedriger Stringenz oder durch PCR-Techniken, sowie die Nutzung des Glukose-Translokators als Ziel ("Target") für Herbizide.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

BESCHREIBUNG

DNA-Sequenzen kodierend einen Glukose-Translokator, Plasmide, Bakterien, Hefen und Pflanzen enthaltend diesen Transporter.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen aus *Zea mays* (Mais), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Spinacia oleracea* (Spinat), die die Kodierregion eines Glukose-Translokators enthalten, deren Einführung in ein pflanzliches Genom die Bildung und Weiterleitung von Kohlenstoffgrundgerüsten in transgenen Pflanzen verändert, Plasmide, 10 Hefen und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenzen, sowie transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung der DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität des Glukose-Translokators und somit Änderungen im Kohlenstoffstoffwechsel hervorgerufen werden. Weiterhin betrifft die Erfindung die Nutzung der beschriebenen 15 Sequenzen des Glukose-Translokators zur Identifizierung verwandter Translokatoren aus anderen Pflanzen (Angiospermen, Gymnospermen, sowie Algen) durch Hybridisierung mit niedriger Stringenz oder durch PCR-Techniken, sowie die Nutzung des Glukose-Translokators als Ziel ("Target") für Herbizide.

20

Die pflanzliche Photosynthese ist der größte Produktionsprozeß der Erde und der einzige Prozeß, der den Gesamtvorrat an nutzbarer Energie auf unserem Planeten vergrößert: mehr als 10 Milliarden Tonnen Kohlenstoff werden jährlich in Kohlenhydrate oder andere 25 organische Materie als Energie und letztlich als unsere Nahrungsgrundlage gespeichert. Diese Energiemenge entspricht etwa 5% der aller bekannten fossilen Energiequellen. Die Photosynthese ist damit die Grundlage allen Lebens. Während dieses in photosynthetisch aktiven Plastiden stattfindenden Prozesses werden aus dem 30 atmosphärischen CO₂, anorganischem Phosphat und Wasser mit Hilfe der im Zuge der Lichtreaktion gebildeten Produkte, Adenosintriphosphat (ATP) und Reduktionsäquivalente (NADPH₂), ein Kohlenstoffgerüst mit 3 C-Atomen, Triosephosphate, synthetisiert. Dieses Primärprodukt der CO₂-Fixierung wird über einen speziellen Translokator

(Triosephosphat/Phosphat-Translokator, TPT; Flügge et al., 1989, EMBO J. 8: 39-46; Flügge et al., 1991, Nature 353: 364-367) aus dem Chloroplasten austransportiert und im Cytoplasma in einer Reihe von aufeinanderfolgenden Reaktionen in Saccharose (Rohrzucker) überführt.

5 Während der Biosynthese von Saccharose wird das anorganische Phosphat wieder freigesetzt und über den oben erwähnten Triosephosphat/Phosphat-Translokator in die Chloroplasten zurücktransportiert. Hier wird aus dem Phosphat neuerlich ATP gebildet, eine Reaktion, die von der lichtgetriebenen ATP-Synthase katalysiert
10 wird. Es ist ersichtlich, daß der von dem Triosephosphat/Phosphat-Translokator katalysierte Export des während des Tages fixierten Kohlenstoffs im Austausch mit anorganischem Phosphat in essentieller Weise die beiden Kompartimente Chloroplast und Cytoplasma verbindet.

15 Während der Lichtperiode können die über die Photosynthese gebildeten Triosephosphate auch in Stärke, die sog. Assimilationsstärke, überführt werden. Dieser Prozeß läuft in den Chloroplasten ab und dient dem Aufbau eines transienten Kohlenstoff-Speichers, auf den die Pflanze während der anschließenden Nacht-Periode zurückgreifen kann. Weiterhin kann auf diesem Wege auch dann Kohlenstoff assimiliert
20 werden, falls die Saccharose-Biosynthese im Cytosol nicht mit der Netto-CO₂-Assimilation Schritt hält. In der folgenden Dunkelperiode wird der Stärkespeicher wieder abgebaut und die Spaltprodukte der Stärkemobilisierung werden aus den Chloroplasten ausgeschleust und, nach einem weiteren Umbau in die Transportform des Photoassimilates
25 (vornehmlich Saccharose), aus dem Blatt exportiert. Somit ist gewährleistet, daß die nicht-grünen Gewebe kontinuierlich, sowohl während des Tages als auch während der Nacht, mit Photoassimilaten versorgt werden.

Der Mobilisierung der Assimilations-Stärke kann sowohl über einen
30 phosphorolytischen als auch über einen hydrolytischen Abbau erfolgen. Im ersten Fall gelangt man zu Hexosephosphaten und letztlich zu Triosephosphaten, die über den oben erwähnten TPT aus den Chloroplasten exportiert werden können. Im Cytosol erfolgt dann die weitere Umsetzung zu Saccharose. Zunächst wird unter Katalyse der
35 Triosephosphat-Isomerase und der Aldolase aus den Triosephosphaten Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat Fruktose-1,6-bisphosphat gebildet. Diese reversiblen Gleichgewichtsreaktionen

werden durch die Abspaltung einer Phosphatgruppe von Fruktose-1,6-bisphosphat in Richtung Fruktose-6-Phosphat vorangetrieben. Allerdings setzt dies die Aktivität der cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) voraus, die als eines der Schlüsselenzyme für die 5 Saccharose-Biosynthese angesehen werden kann. Die FBPase steht allerdings unter strenger Kontrolle von Fruktose 2,6-bisphosphat, einem effizienten negativen Modulator. Die Konzentration dieses FBPase-Inhibitors weist einen diurnalen Rhythmus auf, ist im Licht niedrig und im Dunkel so hoch, daß hier die FBPase weitgehend ausgeschaltet ist 10 (Stitt, 1990, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 153-185). Ist die FBPase nicht aktiv, können aus den Plastiden exportierte Triosephosphate nicht in Saccharose umgesetzt werden. Damit steht auch das für den Export von Triosephosphaten erforderliche Gegentausch-Substrat Phosphat nicht zur Verfügung. Im Plastiden 15 würde Phosphat jedoch als Substrat für den phosphorolytischen Stärkeabbau benötigt. Somit ist anzunehmen, daß die nächtliche Stärkemobilisierung vornehmlich über einen hydrolytischen Abbau erfolgt. So besitzt auch eine Mutante von *Flaveria linearis* mit einer defekten cytosolischen FBPase keinen offensichtlichen Phänotyp. Diese 20 Mutante weist während des Tages einen reduzierten, während der Nachtperiode jedoch einen erhöhten Kohlenstoff-Export aus dem Blatt auf (Zrenner et al., 1996, Plant J. 9: 671-681). Auch Experimente mit einer Hoch-Stärke Mutante, TC265, bestätigen diese Vermutung (siehe unten). Ferner weisen auch NMR Experimente unter Nutzung von 25 Deuterium-markierter Glukose darauf hin, daß während der Nacht der überwiegende Teil des Kohlenstoffs den Chloroplasten, unter Umgehung des TPT und der cytosolischen FBPase, als Glukose verläßt (Schleucher et al., 1998, Plant Physiol. 118: 1439-1445). Einschränkend muß hier angemerkt werden, daß es möglicherweise Pflanzenspezies gibt, in 30 denen der Stärkeabbau überwiegend phosphorolytisch erfolgt (z.B. Erbsen, Stitt et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta 544: 200-214).

Im Gegensatz zum phosphorolytischen Abbau der Stärke liefert der hydrolytische Stärkeabbau - über Amylasen, Maltasen etc. - Glukose, den Grundbaustein der Stärke. Glukose wird über einen speziellen 35 Transporter, den Glukose-Translokator, aus dem Chloroplasten exportiert. Nach Phosphorylierung zu Glukose-6-Phosphat durch das Enzym Hexokinase kann Glukose-6-Phosphat durch die

Glukosephosphat-Isomerase in Fruktose-6-Phosphat überführt werden. Diese Reaktionssequenz umgeht die FBPase-Reaktion. Ein weiteres Molekül Glukose-6-Phosphat wird durch Phosphoglukose-Isomerase zu Glukose-1-Phosphat umgelagert und dann von der UDP-Glukose-5 Pyrophosphorylase (UGPase, Glukose-1-phosphat-Uridyllyltransferase) in UDP-Glukose überführt. UDP-Glukose und Fruktose-6-phosphat werden dann von der Saccharosephosphat-Synthase und der Saccharosephosphat-Phosphatase in Saccharose überführt.

Somit kann festgehalten werden, daß während der laufenden 10 Photosynthese der Export des gebildeten Photoassimilates vorwiegend über den TPT erfolgt, während der Nacht jedoch dem Glukose-Translokator eine entscheidende Rolle im Rahmen des Exportes von mobilisiertem Photoassimilat zukommt. In der Dunkelperiode verbindet daher der Glukose-Translokator in essentieller Weise die beiden 15 Kompartimente Chloroplast und Cytoplasma. Die entscheidende Rolle des Glukose-Translokators bei dem Export von Produkten der Stärke-Mobilisierung wird durch folgende Experimente belegt:

Vor kurzem konnten transgene Pflanzen mit einer modulierten Aktivität des chloroplastidären TPT hergestellt werden. Die Hemmung dieses 20 Transporters *in planta* über die Expression einer entsprechenden "anti-sense" mRNA führt zu einem verminderten Export des primären Photoassimilates (Triosephosphat, 3-Phosphoglycerat), das unter diesen Umständen innerhalb des Chloroplasten in die Biosynthese von Stärke abgeleitet wird, die sich massiv anstaut (Riesmeier et al., 1993, Proc. 25 Natl. Acad. Sci. USA 90: 6160-6164; Heineke et al., 1994, Planta 193: 174-180). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß in den transgenen Pflanzen die akkumulierte Stärke wiederum verstärkt mobilisiert werden kann, wobei diese Mobilisierung je nach Pflanzenspezies während der Nacht (Kartoffel; Heineke et al., 1994, Planta 193: 174-180) oder aber 30 bereits während des Tages erfolgt (Tabak, Häusler et al., 1998, Planta 204: 366-376). Unter Umgehung des in seiner Aktivität herabgesetzten TPT erfolgt in den transgenen Pflanzen die Stärkemobilisierung über den hydrolytischen Weg und der Export der freigesetzten Glukose über den Glukose-Translokator. Es konnte auch gezeigt werden, daß in den 35 transgenen anti-sense TPT-Pflanzen die Aktivität der α -Amylase, der Hexokinase sowie des Glukose-Translokators um den Faktor 2-3 höher ist als in den Kontrollpflanzen.

Die Annahme, daß die Produkte der Stärkemobilisierung des Chloroplasten hauptsächlich als Glukose verlassen, wird auch durch die biochemische Charakterisierung einer sogenannten „starch excess“ 5 *Arabidopsis*-Mutante (TC26, mit einem defekten *sex1* Gen) gestützt, die einen konstant hohen Gehalt an Stärke aufweist (Caspar et al., 1991, Plant Physiol. 95: 1181-1188; Trethewey und ap Rees (1994) Biochem. J. 301, 449-454). Diese Mutante ist aufgrund ihrer Enzymausstattung 10 zwar prinzipiell fähig, Stärke zu Glukose abzubauen. Es konnte gezeigt werden, daß die TC26 Mutante zwar einen funktionellen TPT besitzt, aber Glukose als Produkt des Stärkeabbaues nicht aus den 15 Chloroplasten in das Cytosol transportieren kann. Das mutmaßliche Fehlen des Glukose-Translokators führt zu einem Anstau der Stärke-Abbauprodukte und damit zu einer Neusynthese von Stärke verbunden mit dem beobachteten hohen Stärkegehalt. Zusammengenommen 20 unterstreichen die diskutierten Experimente die entscheidende Bedeutung des Glukose-Translokators bei dem Export von Kohlenstoffgerüsten aus dem Stärkeabbau. Der Glukose-Translokator wurde 1977 erstmalig beschrieben (Schäfer et al., 1977, Plant Physiol. 60: 286-289), eine weitergehende biochemische bzw. molekulare Charakterisierung dieses Transportsystems steht jedoch aus.

Der beschriebene und in den Blättern (dem "Source"-Gewebe) stattfindende Prozeß der Photoassimilat-Produktion dient in hohem Maße der Versorgung von nicht-grünen Organen (dem "Sink"-Gewebe), wie Wurzel, Knolle und Frucht, also auch den erntebaren Teilen der 25 Pflanzen. In Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Zuckerrüben und Getreiden erfolgt der Transport von Kohlenhydraten von den "Source"- zu den "Sink"-Geweben über die Siebröhren (das Phloem) ausschließlich in Form von Saccharose. Die Saccharose wird anschließend aus dem Phloem in die Zellen des "Sink"-Gewebes transportiert (Phloem- 30 Entladung). Der Transport kann entweder direkt d.h. symplastisch über zwischen dem Phloem und dem "Sink"-Gewebe bestehende Verbindungen (Plasmodesmen) erfolgen oder aber apoplastisch, was eine Entladung der Saccharose in die Zellwand und ihren erneuten Import in die Zielzellen beinhaltet. Alternativ kann die Saccharose im 35 Apoplasten von einer zellwandspezifischen Invertase in Hexosen gespalten werden, die anschließend in die Zellen des "Sink"-Gewebes transportiert werden. Erfolgt der Eintransport in Form von Saccharose,

wird diese im Cytoplasma der Zellen des "Sink"-Gewebes in Hexosen gespalten (Glukose und Fruktose). Dies geschieht entweder über Invertasen oder über die Saccharose-Synthase. Alle Spaltprodukte der Saccharose werden letztendlich wieder in Hexosephosphate (Glukose-6-phosphat, Glukose-1-phosphat) überführt.

In den meisten Pflanzen dient Glukose-6-phosphat dann als Substrat für die Stärkesynthese, deren gesamte Reaktionsfolge im Innenraum (Stroma) der Amyloplasten des "Sink"-Gewebes lokalisiert ist. Diese Organellen sind von zwei Lipiddoppelschichtmembranen umschlossen, 10 von denen die äußere Membran auf Grund der Anwesenheit von porenbildenden Proteinen (Porinen) unspezifisch permeabel ist für kleinere Moleküle. Ein solches Porin der äußeren Amyloplasten-Hüllmembran konnte kürzlich von uns identifiziert und die Abfolge seiner das Protein zusammensetzenen Aminosäurebausteine aufgeklärt 15 werden (Fischer et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 25754-25760). Die innere Hüllmembran ist dagegen die eigentliche Permeabilitätsgrenze zwischen dem Cytoplasma und den Organellen und ist, wie *a priori* jede Lipid-Doppelschicht, prinzipiell impermeabel für größere geladene Moleküle wie z.B. Hexosephosphat. Diese prinzipielle Undurchlässigkeit 20 der inneren Amyloplasten-Hüllmembran für größere hydrophile Moleküle wird durch die Anwesenheit spezifischer Transportsysteme überbrückt

Glukose-6-phosphat wird über einen kürzlich von uns charakterisierten Transporter, den Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT) in die Plastiden importiert (Kammerer et al. (1998) *Plant Cell* 10: 105-117). 25 Innerhalb des Plastiden kann das importierte Glukose-6-phosphat dann in die Biosynthese von Stärke eingespeist werden. Der Eintransport in die Amyloplasten erfolgt in einem Gegentausch-Mechanismus, hier im Austausch mit anorganischem Phosphat, das im Zuge der Stärkesynthese freigesetzt. Glukose-6-phosphat wird in Glukose-1- 30 phosphat umgesetzt, das dann über die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) in ADP-Glukose, dem Substrat für die Stärke-Synthase, umgesetzt wird. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß im Endosperm einiger Getreide (Gerste, Mais) die AGPase auch im Cytosol lokalisiert ist und der Eintransport der Vorstufen für die 35 Stärkebiosynthese über ADP-Glukose erfolgen kann (Denyer et al., 1996, *Plant Physiol.* 112: 779-785).

Eine Ausnahme stellen hier möglicherweise fettspeichernde Plastiden von *Rizinus communis* dar. Hier gibt es Hinweise, daß Glukose direkt über einen Glukose-Transporter aus dem Cytosol in die Plastiden aufgenommen wird und dort durch eine plastidäre Hexokinase zu 5 Glukose-6-phosphat phosphoryliert wird. (Dennis und Miernyk, 1982, Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 27-50).

Das importierte Glukose-6-phosphat ist auch Ausgangssubstrat für den oxidativen Pentosephosphat-Weg (OPPP), der Reduktionsäquivalente, hauptsächlich für die dort stattfindende Reduktion des aus dem Nitrat 10 gebildeten Nitrits zum Ammonium, das seinerseits in die Biosynthese von Aminosäuren/Proteinen abgeführt wird, bereit stellt. In diesem Fall erfolgt der Eintransport von Glukose-6-phosphat im Austausch mit Triosephosphaten, den Produkten des OPPP (Kammerer et al. (1998) Plant Cell 10: 105-117).

15 Die in den nicht-grünen Plastiden gebildete Stärke unterliegt, wie auch die Assimilationsstärke der Chloroplasten, einen dauernden Auf- und Abbau (Stitt und Heldt, 1991, Biochim. Biophys. Acta 638: 1-11). Ist die Synthesegeschwindigkeit höher als die des Abbaues, wird die Stärke als ein langfristiger Speicher für den fixierten Kohlenstoff angelegt. Die in 20 den (erntebaren) Speichern abgelegte Stärke dient dann als Grundlage für die tierische/menschliche Ernährung (z.B. Stärke in Kartoffelknollen, Maiskörnern). Bei der Auskeimung von Samen wird die Stärke remobilisiert und die Produkte des Stärkeabbaues dienen dann als Brennstoff für den entstehenden Keimling. Es ist davon auszugehen, 25 daß, wie oben am Beispiel des Abbaues von chloroplastidärer Assimilationsstärke ausgeführt, dem Glukose-Translokator der nicht-grünen Plastiden bei der Mobilisierung der Speicherstärke eine entscheidende Rolle zukommt.

Wie aus den Ausführungen ersichtlich wird, sind Transporter - wie der 30 chloroplastidäre Triosephosphat-Phosphat-Translokator, der den Austransport des fixierten Kohlenstoffs aus dem Chloroplasten katalysiert, der Saccharose-Translokator, über den die Siebröhren mit der Transportform des Photoassimilates Saccharose beladen werden, der Glukose-6-phosphat-Phosphat-Translokator der Amyloplasten, der 35 das Ausgangssubstrat für die Stärkesynthese bereitstellt, oder der Glukose-Translokator, über den die Abbauprodukte der

Stärkemobilisierung die Plastiden verlassen - in die Allokation des Photoassimilates von den "Source"- zu den "Sink"-Organen an entscheidender Stelle eingebunden. Änderungen der Aktivität eines spezifischen Membran-Transporters können große Auswirkungen auf die

5 Stoffwechselleistungen der Pflanzen haben. So konnte vor kurzem gezeigt werden, daß die Effektivität der photosynthetischen Kohlenstoffreduktion (Lichtreaktion und Calvin-Zyklus) ganz wesentlich durch die Aktivität des chloroplastidären Triosephosphat-Phosphat-Translokators beeinflußt werden kann (siehe oben). Auch die Reduktion

10 der Saccharose-Transport-Aktivität über eine "anti-sense"-Inhibierung des für den Transport in die Siebröhren verantwortlichen Saccharose-Transporters (Riesmeier et al., 1992, EMBO J. 11: 4705-4713) führt zu einem drastischen Phänotyp der Pflanzen: sie sind wesentlich kleiner, die Blätter sind geschädigt und die Pflanzen bilden, im Fall der

15 Kartoffeln, kaum noch Knollen aus d. h. die Versorgung der "Sink"-Gewebe mit Photoassimilaten ist stark reduziert (Riesmeier et al., 1994, EMBO J. 13: 1-7).

Wie ausgeführt, kommt dem Glukose-Translokator eine zentrale Rolle bei dem Transport von Abbauprodukten der Stärkehydrolyse aus

20 photosynthetisch aktiven und nicht-grünen Plastiden zu. Gelänge es, diesen Translokator zu klonieren und mit Hilfe der erhaltenen Sequenz die Aktivität des Translokators in Pflanzen zu verändern, eröffnete dies z.B. die Möglichkeit, den Stärkegehalt der Pflanzen und damit ihre Trockenmasse zu erhöhen.

25 Wie Stark et al. (Science 258: 287-292) 1992 gezeigt haben, konnte der Fluß in Richtung Stärkesynthese in Kartoffelknollen über die Überexpression einer ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase), einem amyloplastidären Enzym der Stärke-Biosynthese, erhöht werden. Für diese Versuche wurde ein Enzym aus *E. coli* eingesetzt, das nicht

30 der metabolischen Kontrolle über den 3-Phosphoglycerat/Phosphat Quotienten unterliegt Detailliertere Analysen der transgenen Pflanzen zeigten allerdings, daß der erhöhte Kohlenstoff-Fluß in die Stärke verbunden war mit einem erhöhten Stärke-Turnover, bedingt durch einen erhöhten Abbau der Stärke (Sweetlove et al., 1996, Biochem. J. 320: 35 493-498).

Es läßt sich folgern, daß, um einen erhöhten Stärkegehalt in Pflanzen zu erreichen, vorzugsweise der Turnover, d.h. der Stärkeabbau und die weitere Verwendung und der Export des Abbauproduktes Glukose, verhindert werden muß. Pflanzen mit einer reduzierten Aktivität des 5 plastidären Glukose-Translokators könnten die Produkte des amylolytischen Stärkeabbaues, Glukose, nicht mehr aus den Plastiden exportieren. Somit würde die Glukose umgehend wieder in den Stärkeaufbau eingeschleust bzw. der weitere Stärkeabbau durch sein Produkt Glukose gehemmt und der Gehalt an Stärke erhöht werden. Ein 10 solches Vorgehen läßt sich auch ableiten aus den oben geschilderten Untersuchungen zur Hoch-Stärke-Mutante TC265, die aufgrund der mutmaßlichen Defizienz im Glukose-Translokator einen hohen Gehalt an Stärke aufweist.

Eine Erhöhung des Stärkegehaltes der Kartoffelknolle wäre sowohl für 15 die stärkeverarbeitende Industrie als auch für die Nahrungsmittel-Industrie von Bedeutung, da Kartoffeln mit einem erhöhten Stärkegehalt während ihrer Prozessierung zu Chips, Pommes frites, Gebäck etc. weniger Fett aufnehmen und daher zu kalorienärmeren Endprodukten führen. Erfolgreiche Strategien wären mit hoher Wahrscheinlichkeit auch 20 auf die Nutzung anderer stärkespeichernder Pflanzen wie z.B. Mais, Weizen und Gerste übertragbar.

Gelänge es, Kartoffeln mit einer verminderten Aktivität des Glukose-Translokators zu erzeugen, könnten auch Lagerungsverluste, die über das sog. "cold-sweetening" entstehen, vermieden werden. Kartoffeln 25 werden, zur Vermeidung der Auskeimung, bei tiefen Temperaturen (6-8°C) gelagert. Dies führt jedoch zu dem unerwünschten Effekt der Akkumulation von löslichen Zuckern, dem erwähnten "cold-sweetening". Die Bildung reduzierender Zucker ist, auf Grund der auftretenden Maillard-Reaktion, ein äußerst negativer Parameter während der 30 weiteren Prozessierung der Kartoffeln wie der Herstellung von Chips etc.. Die Bildung löslicher Zucker - Hydrolyseprodukte der Stärke, die im extraplastidären Kompartiment akkumulieren - könnte verhindert werden, indem der Glukose-Translokator, der in den Austransport der aus dem Stärkeabbau stammenden Produkte eingebunden ist, während der 35 Lagerungsphase der Kartoffeln ausgeschaltet werden könnte. Verstärkt werden könnte dieser Effekt durch eine simultane Reduktion des von uns kürzlich beschriebenen Glukose-6-phosphat/Phosphat-

Translokators, der die aus dem phosphorolytischen Stärkeabbau stammenden phosphorylierten C3-Körper aus den Plastiden exportiert (Kammerer et al., 1998, Plant Cell 10: 105-117).

Wie oben ausgeführt, erfolgt der Export der im Rahmen der 5 Photosynthese gebildeten Photoassimilate während des Tages vorwiegend über den TPT. Experimente mit transgenen Pflanzen, in denen die Aktivität des TPT über eine Repression bzw. Überexpression der entsprechenden RNA entweder reduziert oder erhöht war, zeigen, daß der TPT limitierend auf die Photosynthese und die Biosynthese von 10 Saccharose wirken kann, insbesondere unter Hochlicht und bei optimaler CO₂-Versorgung (Häusler et al., 1998, Planta 204: 366-376; Häusler et al., unveröffentlichte Beobachtungen). Es ist vorstellbar, über eine Überexpression des Glukose-Translokators eine erhöhte Ableitung des fixierten Kohlenstoffs zu erreichen, insbesondere bei einer 15 simultanen Überexpression der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase, die zu einen erhöhten Stärke-Turnover führt, bedingt durch einen erhöhten Abbau der Stärke (Sweetlove et al., 1996, Biochem. J. 320: 493-498). Der fixierte Kohlenstoff würde hier alternativ als Glukose bereitgestellt, das über den Glukose-Translokator den Chloroplasten ausgeschleust 20 wird.

Die Adressierung der plastidären Translokatoren zu der inneren Hüllmembran der Plastiden bedarf einer entsprechenden Präsequenz ("Targeting-Sequenz"), die das anhängende reife Protein korrekt zu den Plastiden dirigiert (Übersichtsartikel hierzu: Keegstra et al., 1989, Annu. 25 Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 471-501; Lubben et al., 1988, Photosynth. Res. 17: 173-194; Flügge, 1990, J. Cell Sci. 96: 351-354). Neben der für die "Plastiden-Adressierung" nötigen Präsequenz gibt es im reifen Teil (der Teil des Proteins, der nach der Abspaltung der Präsequenz durch eine spezifische Protease verbleibt) der 30 Plastidenhüllmembran-Proteine noch weitere Informationen, die für die spezifische Insertion der Proteine in die Membran verantwortlich sind

und einen Transport der Hüllmembranproteine über die Hüllmembran in das Plastidenstroma oder, im Fall der Chloroplasten, die Thylakoidmembran verhindern (Knight und Gray, 1995, Plant Cell 7: 1421-1432 bzw. eigene Untersuchungen: Brink et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 20808-20815). Eigene Arbeiten zeigten ferner am Beispiel eines mitochondrialen Carriers, des ADP/ATP-Transporters, daß dieses Protein nicht oder nur mit einer sehr geringen Effizienz zu Plastiden dirigiert und dort in die Hüllmembran eingebaut werden kann. Selbst ein Hybridprotein, bestehend aus einer plastidären Präsequenz (die 10 Information für die Plastiden-Adressierung enthaltend) und diesem mitochondrialen Carrier, zeigte gegenüber dem authentischen Protein einen kaum erhöhten Einbau in die Plastiden-Hüllmembran (Silva-Filho et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 15264-15269; unveröffentlichte Beobachtungen). Da für eine korrekte Insertion die Protein/Lipid- 15 Wechselwirkung von Bedeutung ist und sich die plastidäre Hüllmembran in ihrer Lipidzusammensetzung grundlegend von der anderer Zellorganellen und auch der Bakterien unterscheidet (Joyard et al., 1991, Eur. J. Biochem. 199: 489-509), ist es sehr unwahrscheinlich, daß eine, wenn auch geringfügige, Insertion eines heterologen Proteins, 20 dann auch funktionell ist, d.h., daß ein Transporter aus anderen Systemen überhaupt in einer seiner Funktion entsprechenden Konformation und Orientierung in die Plastiden-Hüllmembran eingebaut werden kann.

Somit ist es nach gegenwärtigem Stand der Technik nicht möglich, mit 25 Hilfe bekannter Plastiden-"Targeting"-Sequenzen z.B. mitochondriale oder prokaryontische Transporter funktionell in die innere Plastidenhüllmembran zu integrieren. Beim gegenwärtigen Stand der Technik ist es erfolgversprechender, die für die Konstruktion der oben geschilderten Pflanzen notwendige DNA-Sequenz durch Klonierung des 30 authentischen plastidären Glukose-Translokators zu erhalten.

Obwohl dieses Transportsystem den Transport von Glukose katalysiert, ist seine Primärstruktur anzunehmenderweise sehr unterschiedlich zu der der Glukose-Transporter aus der Plasmamembran. Diese Transporter gehören zu einer großen Gen-Familie der Monosaccharid-5 Transporter (Sauer und Tanner, 1993, Bot. Acta 106: 277-286; Weig et al., 1994, J. Plant Physiol. 143: 178-183).

Wie oben ausgeführt, haben physiologische und biochemische Untersuchungen der *Arabidopsis*-Hochstärkemutante TC265 zu der Vermutung geführt, daß diese Mutante einen Defekt im chloroplastidären 10 Glukose-Translokator aufweist. Es wurde versucht, dieses Gen über einen kartengestützten Ansatz zu klonieren. Über Kreuzungen der TC265 Mutante (Ökotyp Columbia) mit einem *Arabidopsis*-Wildtyp (Ökotyp Landsberg *erecta*) konnte das für die Mutation verantwortliche Gen auf Chromosom 1 lokalisiert werden (eigene, unveröffentlichte 15 Untersuchungen). In diesem genomischen DNA-Bereich konnte jedoch keine für einen putativen Glukose-Translokator kodierende Sequenz identifiziert werden.

Um die Primärstruktur des plastidären Glukose-Translokators zu ermitteln, mußte daher der bei Membranproteinen außerordentlich 20 schwierige Weg der biochemischen Charakterisierung, Reinigung und Isolation des Transportproteins beschritten werden. Ausgehend von chloroplastidären Hüllmembranen aus Spinat gelang es, dieses Protein - über chromatographische Methoden in Verbindung mit Substratschutz-Experimenten gegenüber der Markierung mit einem radioaktiv 25 markierten Inhibitor N-Ethylmaleimid - als eine Komponente der inneren Chloroplasten-Hüllmembran mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 43,000 Dalton zu identifizieren.

Der N-Terminus des Translokators erwies sich als chemisch modifiziert und somit einer N-terminalen Proteinsequenzierung durch 30 automatisierten Edman-Abbau nicht zugänglich. Daher war es nötig, das Protein durch präparative SDS-Polyacrylamidgelektrophorese in ausreichender Menge zu isolieren und mit einer Protease (Lys-C) enzymatisch zu spalten, um interne Peptidsequenzen zu ermitteln (siehe **Ausführungsbeispiel 1**). Es konnte auf diese Weise die 35 folgende Peptidsequenz erhalten werden: (1) KGRSLEELIELALSPAV. Es gelang, mittels der 3'-RACE-Methode (rapid amplification of cDNA ends)

und unter Nutzung von degenerierten (nach dem erhaltenen Peptid modellierten) synthetischen Oligonukleotiden, ein spezifisches PCR-Fragment zu erhalten. Dies wurde als Sonde für die anschließende Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus Spinat-Blättern genutzt und 5 es gelang, einen cDNA-Klon zu isolieren, der die vollständige cDNA (1864 Basenpaare) für das Vorstufenprotein des chloroplastidären Glukose-Translokators mit einer molekularen Masse von 57.6 kDa enthielt (siehe **Ausführungsbeispiel 2**). Die cDNA aus Spinat wurde anschließend benutzt, um die entsprechenden cDNA Klonen aus 10 Geweben von *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* (Mais), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Nicotiana tabacum* (Tabak) zu isolieren. Die Integration der DNA aus *Spinacia oleracea* in das Genom der TC265 Mutante führte nicht zu einer Komplementation des mutanten Phänotyps (eigene, unveröffentlichte Beobachtungen), was wiederum belegt, daß 15 das für den Glukose-Translokator kodierende Gen nicht durch eine kartengestützte Klonierung des *sex1*-Gens isoliert werden kann. Wir konnten ferner zeigen, daß das von uns identifizierte Glukose-Translokator Gen aus *Arabidopsis thaliana* auf Chromosom 5 lokalisiert ist. Ein weiteres homologes *Arabidopsis* Translokator Gen konnte auf 20 Chromosom 1 ca. 4 cM oberhalb des *sex1*-Lokus lokalisiert werden (eigene, unveröffentlichte Beobachtungen).

Ein Vergleich der erhaltenen cDNA-Sequenzen mit Sequenzen der Datenbanken ergab, daß nur geringe Ähnlichkeiten mit den bekannten Glukose-Transportern der Plasmamembran vorhanden waren (< 30 %) 25 und die Homologien zu bakteriellen Hexose-Transportern im Bereich von ca. 45 % lagen. Es zeigte sich ferner eine ca. 73 %ige Homologie zu einem hypothetischen Zuckertransporter aus *Prunus armeniaca* (Aprikose). Die abgeleitete molekulare Masse dieses Transporters beträgt ca. 49.8 kDa. Hier wurde allerdings für die Translation der DNA 30 das falsche Startkodon benutzt und damit übersehen, daß dieses Protein über eine zusätzliche N-terminale Extension verfügt, die als plastidäres Adressierungssignal dienen könnte. Eine Zuordnung zu einer zellulären Membran oder einem Organell konnte daher für das in Aprikose identifizierte Gen nicht getroffen werden. Wir konnten hingegen 35 zeigen, daß der chloroplastidäre Glukose-Translokator als Vorstufenprotein synthetisiert wird sowie posttranslational und unter Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz in die Chloroplasten

importiert und in die Hüllmembranen inseriert wird (siehe **Ausführungsbeispiel 3**).

Die vorliegende Erfindung stellt DNA-Sequenzen zur Verfügung, die aus einem pflanzlichen Genom stammen und für plastidäre Glukose-

- 5 Translokatoren kodieren, wobei die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information bei Einführung und Expression in pflanzlichen Zellen zur Bildung einer Ribonukleinsäure führt und über diese Ribonukleinsäure eine Glukose-Translokator Aktivität in die Zellen eingeführt werden kann oder eine endogene Glukose-Translokator Aktivität unterdrückt werden
- 10 kann. Gegenstand der Erfindung sind insbesondere die DNA-Sequenzen aus *Zea mays* (Mais), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Spinacia oleracea* (Spinat) mit den im Anhang dargestellten Nukleotidabfolgen (Sequenzprotokolle).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die mit

- 15 den im Anhang aufgeführten DNA-Sequenzen oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein plastidäres Protein kodieren, das die biologische Aktivität eines Glukose-Translokators besitzt.

- 20 Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen begleitet sind, zur Transformation pro- und eukaryontischer Zellen. Um die Expression des Glukose-Translokators in transformierten
- 25 Zellen zu gewährleisten, können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in Vektoren eingebracht werden und dabei mit Steuerelementen für die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen kombiniert werden (siehe **Ausführungsbeispiele 3 und 5**). Derartige Steuerelemente sind
- 30 einerseits Transkriptions-Promotoren und andererseits Transkriptions-Terminatoren. Mit den Vektoren können eukaryontische Zellen transformiert werden mit dem Ziel der Expression einer übersetzbaren Botenribonukleinsäure (RNA), die die Synthese eines plastidären Glukose-Translokators in den transformierten Zellen erlaubt, oder mit
- 35 dem Ziel der Expression einer nicht übersetzbaren, invers orientierten ("anti-sense"), Botenribonukleinsäure, die die Synthese des endogenen

Glukose-Translokators verhindert. Zu diesem Zweck könnten auch kürzere Fragmente der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit einem relativ hohen Grad an Homologie (mehr als ca. 65 % Homologie) verwendet werden. Eine Repression kann auch über die Überexpression 5 der homologen DNAs erreicht werden (Ko-Supression). Ebenso kann die Expression von endogenen Glukose-Translokatoren durch die Expression eines für diesen Zweck konstruierten Ribozyms unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen inhibiert werden; ferner über eine Insertionsmutagenese - oder, sobald die entsprechende 10 Technologie zur Verfügung steht, durch eine homologe Rekombination ("knock-out"-Mutante). Durch eine gewebespezifische kontrollierte Expression einer RNA entsprechend den erfindungsgemäßen Sequenzen eines pflanzlichen Glukose-Translokators ist eine Veränderung des pflanzlichen Kohlenstoffmetabolismus möglich, deren 15 wirtschaftliche Bedeutung darin liegt, daß eine verbesserte Ableitung der Photoassimilate aus den Chloroplasten erreicht wird bzw. die Abbauprodukte der Stärkemobilisation in den Plastiden zurückgehalten werden.

Es können somit Pflanzen erzeugt werden, die einen erhöhten 20 Stärkegehalt aufweisen und/oder - im Fall z.B. der Kartoffel - verminderte Lagerungsverluste aufweisen. Diese Modifikation steigert den ernährungsphysiologischen Wert von Pflanzen und damit auch deren wirtschaftlichen Wert. Die jeweiligen Effekte ließen sich möglicherweise noch steigern, falls die gewebespezifische Expression 25 des Glukose-Translokators im Blatt bzw. in heterotrophen "Sink"-Gewebe mit der weiterer Translokatoren/Enzyme des Kohlenstoff-/Stickstoff-Metabolismus kombiniert würde (Simultane Expression mehrerer Zielproteine wie z.B. bei der Erhöhung des Stärkegehaltes oder der Verminderung von Lagerungsverlusten der Kartoffel).

30 Weiterhin ermöglicht die heterologe Expression der beschriebenen Sequenzen in Spalthefen (**Ausführungsbeispiel 4** und Loddenkötter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2155-2159) Struktur-Funktionsstudien des Glukose-Translokators, die letztendlich zur Entwicklung eines spezifischen Hemmstoffs für dieses Protein führen 35 könnten; insbesondere ist hier an die Herbizidentwicklung zu denken, da die Hemmung eines Proteins mit Schlüsselfunktion im Stoffwechselgeschehen zwangsläufig letal für die Pflanze wäre. Ferner

sind diese Struktur-Funktionsstudien Grundlage für eine gerichtete Mutagenese der Substratbindungsstelle des Translokators, um die Substratspezifität des Transporters gezielt zu verändern.

Es sind bereits Verfahren zur genetischen Modifikation dikotyler und 5 monokotyler Pflanzen bekannt (Gasser und Fraley, 1989, *Science* 244: 1293-1299; Potrykus, 1991, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225). Zur Expression von kodierenden Sequenzen in Pflanzen müssen diese mit transkriptionell regulatorischen Elementen verknüpft werden. Solche Elemente, Promotoren genannt, sind bekannt (u.a. 10 Koster-Töpfer et al., 1989, *Mol. Gen. Genet.* 219: 390-396). Ferner müssen die Kodierregionen mit einem Transkriptionsterminations-Signal versehen werden, damit sie korrekt transkribiert werden können. Solche Elemente sind ebenfalls beschrieben (Gielen et al., 1989, *EMBO J.* 8, 23-29). Der transkriptionelle Startbereich kann sowohl nativ bzw. 15 homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar. Die DNA-Sequenz der Transkriptionsstart- und Terminations-Regionen kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen 20 enthalten. Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen sind eine große Anzahl Klonierungsvektoren verfügbar, die ein Replikationssignal für *E. coli* und einen Marker beinhalten, der eine Selektion der transformierten Zellen erlaubt. Beispiele für Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13 mp-Serien, pACYC 184 usw. Je nach 25 Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanze können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanze das Ti oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich den einzuführenden 30 Genen angefügt werden. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend beschrieben (Hoekema, in: *The Binary Plant Vector System*, Offset-drukkerij Kanters B-V. Abllasserdam, 1985, Chapter V; Fraley et al., *Critic. Rev. Plant Sci.* 4: 1-46; An et al., 1985, *EMBO J.* 4: 35 277-287). Ist die eingeführte DNA einmal im Genom integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise

einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen einen Resistenz gegenüber Bioziden (wie Basta) oder Antibiotika (wie Kanamycin, Bleomycin oder Hygromycin) verleiht. Der individuell eingeführte Marker wird daher die Selektion transformierter Zellen 5 gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen neben der Transformation mit Hilfe von Agrobakterien viele andere Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation von Protoplasten, die Mikroinjektion von DNA, die Elektroporation sowie 10 ballistische Methoden. Aus dem transformierten Pflanzenmaterial können dann in einem geeigneten Selektionsmedium ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mit gängigen molekularbiologischen Methoden auf die Anwesenheit der eingeführten DNA getestet werden. Diese Pflanzen können normal 15 angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden Hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen (oder Derivate oder Teile 20 dieser Sequenzen) können auch in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen erlauben. Dadurch kann die Spezifität des Glukose-Translokators verändert werden z.B. in Richtung einer Affinität für 25 Fruktose oder Galaktose.

Ebenso könnte eine Unempfindlichkeit des Glukose-Translokators für spezifische Herbizide erreicht werden. Mit Hilfe von Standardverfahren (Sambrock et al., 1989, Molecular cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können 30 Basenaustausche und/oder Basendeletionen vorgenommen und/oder synthetische oder natürliche Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können Adapter oder *linker* angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die nicht benötigte DNA 35 entfernen, eingesetzt werden. Dort wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen oder Transversionen in Frage

kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysenmethode werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden wie z.B. die Expression 5 des modifizierten Proteins in Hefen und die Messung der modifizierten Transporteigenschaften in artifiziellen Liposomen (siehe Ausführungsbeispiel 4; Loddenkötter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2155-2159; Fischer et al., 1997, Plant Cell, 9: 453-462; Kammerer et al., 1998, Plant Cell 10: 105-117) oder die Messung der 10 modifizierten Transporteigenschaften am in transgenen Pflanzen exprimierten Protein mit Hilfe einer kürzlich von uns zu diesem Zweck entwickelten Methode (Flügge und Weber, 1994, Planta, 194: 181-185) angewandt.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen (oder Teile oder Derivate 15 dieser Sequenzen) können dazu genutzt werden, nach Standardverfahren (insbesondere Hybridisierungs-Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken mit niedriger Stringenz unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Teilen der DNA-Sequenzen als Sonde oder die Erstellung von Sonden für stringente und niedrig 20 stringente Durchmusterungs-Strategien durch Ableitung von degenerierten und/oder nicht degenerierten Primern aus den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen für PCR-Experimente mit DNA oder cDNA aus anderen Pflanzen) aus dem Genom von Pflanzen ähnliche Sequenzen zu isolieren, die für Proteine kodieren, die ebenfalls 25 Glukose transportieren.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthalten im übersetzten Protein Bereiche, die in der Lage sind, die im Cytoplasma an Ribosomen synthetisierten Proteine spezifisch zu Plastiden zu dirigieren und das Auftreten der Proteine in anderen Membransystemen der Zelle zu 30 verhindern. Der Proteinbereich, der das durch die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kodierte Protein zu Plastiden dirigiert, liegt jeweilig innerhalb der ersten 90 Aminosäuren des Proteins, ist für die Transportfunktion des Proteins nicht erforderlich und wird nach erfolgreicher Insertion des Proteins in die Plastidenhüllmembran 35 entfernt. Durch Austausch dieser "Plastid-targeting"-Sequenzen gegen eine der bekannten "Targeting"-Sequenzen z.B. für Mitochondrien ließe sich das Translokator-Protein in ein anderes Membransystem

eukaryontischer Zellen dirigieren und könnte dort möglicherweise die Transporteigenschaften über die respektive Membran verändern. Ebenso könnten die "Plastid-targeting"-Sequenzen des Glukose-Translokators oder endogene Bereiche des reifen Proteins dazu genutzt werden, fremde Proteine (z.B. bakterielle Transportproteine oder Transporter aus Hefen) in die Plastiden bzw. in die Plastidenhüllmembran pflanzlicher Zellen zu dirigieren.

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden die wichtigsten eingesetzten Verfahren im folgenden erläutert.

1. Klonierungsverfahren

15 Zur Klonierung wurden der Phage LambdaZAP II sowie das Phagemid pBluescript II SK (pBSC) (Short et al., 1988, Nucl. Acids Res. 16: 7583-7600) verwendet.

20 Für die Transformation von Hefen wurde der Vektor pEVP11 (Russel und Nurse, 1986, Cell 45: 145-153) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Sci. 66: 221-230) kloniert.

2. Bakterien- und Hefestämme

Für das pBluescriptSK (pBSC) Phagemid sowie für pEVP11- und pBinAR-Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Hanahan et al., 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) verwendet.

- 5 Die Transformation der pBinAR-Konstrukte in Tabakpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1, pGV2260 (Bevan, 1984, Nucl. Acids Res. 12: 8711-8720) durchgeführt.

10 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA in die Agrobakterien erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen und Willmitzer (1988, Nucl. Acids Res. 16: 9877). Die Plasmid-DNA transformierter 15 Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelektrophoretisch auf Richtigkeit und Orientierung analysiert.

4. Pflanzentransformation

Pro Transformation wurden 15 kleine Blätter einer Tabak-Sterilkultur unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in Stückchen von ca. 5 1 cm Kantenlänge zerschnitten. Die Blattstückchen wurden in MS-Medium mit 2 % Glukose überführt, in welches dann mit einer Impföse von einer unter strenger Selektion auf Agarplatten gewachsenen, transformierten *Agrobacterium tumefaciens*-Kultur Bakterienzellen in das Medium eingerührt wurden.. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die 10 Blätter auf MS-Medium mit 1.6 % Glukose für zwei Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Blattstückchen auf ein MS-Medium mit 2 % Saccharose, 2 mg/l Kinetin, 500 mg/l Betabactyl®, 15 mg/l Hygromycin (bzw. 100 mg/l Kanamycin) und 0.8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3.000 Lux 15 Beleuchtungsstärke wurde die Betabactylkonzentration im Medium um die Hälfte reduziert. Aus den Blattstückchen wuchsen ohne ausgeprägte Kallusphase kleine Schößlinge, die zur Wurzelbildung auf ein MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Betabactyl und 100 mg/l Kanamycin überführt wurden. Nach Wurzelbildung wurden die 20 Schößlinge in Erdkultur überführt.

Die Transformation von *Arabidopsis* erfolgte nach der Methode von Bechtold et al., 1993, C.R. Acad. Sci. 316: 1194-1199.

Hinterlegungen:

25

Am 10. Juni 1998 bzw. am 10. Juni 1999 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, folgende Phagemide in Form von *E. coli* Stämmen, enthaltend diese Phagemide, hinterlegt:

30

Phagemid pBSC-E43/30-3

(DSM 12243)

Phageimid	pBSC-Zm-pGT	(DSM 12862)
Phageimid	pBSC-St-pGT	(DSM 12863)

Ausführungsbeispiel 1

5 *Isolation des Glukose -Translokators, Gewinnung von Peptidfragmenten dieses Translokators und Erstellung von Sonden für die Hybridisationsdurchmusterung von cDNA Bibliotheken*

Die Identifikation des Glukose-Translokators in Hüllmembranen von Spinat-Chloroplasten erfolgte durch eine Kombination von radioaktiven Markierungs-10 Experimenten und Substratschutz-Experimenten. Es konnte gezeigt werden, daß der Transport von Glukose in isolierte Chloroplasten bereits durch sehr niedrige Konzentrationen der Sulfhydryl-Reagenzien pCMBS und NEM inhibiert werden konnte.

15 Isolierte Chloroplasten wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Glukose, Maltose und Sorbit mit dem radioaktiv markierten Sulfhydryl-Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) versetzt. Anschließend wurden die Chloroplasten-Hüllmembranen isoliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und von den fixierten, gefärbten und getrockneten Gelen Fluorographien angefertigt. Es zeigte sich, daß ein Protein mit einer apparenten 20 molekularen Masse von 43 kDa im SDS-PAGE unter den verschiedenen Bedingungen differentiell markiert wurde.

Das auf diesem Wege als Glukose-Translokator identifizierte Protein wurde anschließend aus den Chloroplasten-Hüllmembranen durch eine Extraktion der Membranen mit einem Gemisch aus Chloroform und 25 Methanol (2:1) gemeinsam mit vier weiteren Proteinen extrahiert. Der stark lipidhaltige Extrakt war einer Auftrennung in präparativen SDS-Gelen nicht direkt zugänglich und mußte zunächst mit Hexan delipidiert werden.

30 Es folgte die Darstellung des Proteins in präparativen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970, Nature 227: 680-685). Nach Detektion des Proteins durch Anfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue R-250 wurde eine 43 kDa Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten und in der Gelmatrix mit der Endoprotease Lys-C gespalten (Fresco, 1979, Anal. Biochem. 97: 382-386). Die resultierenden Peptide wurden aus

dem Gel eluiert und mittels HPLC aufgetrennt (Eckerskorn und Lottspeich, 1989, *Chromatographia*, 28: 92-94). Die Aminosäuresequenz der gereinigten Peptidfraktionen wurde durch automatisierten Edman-Abbau in der Gasphase bestimmt (Eckerskorn et al., 1988, *Eur. J. Biochem.* 176: 509-519). Aus der Aminosäuresequenz von einem der beiden Peptide (Peptid 1) wurden zwei degenerierte Oligonukleotidsequenzen, kodierend diese Aminosäuresequenz, abgeleitet und das betreffende Oligonukleotid durch *in vitro* DNA-Synthese hergestellt.

10

Ausführungsbeispiel 2

Klonierung des Glukose-Translokators

Spinatblätter wurden in der Mitte der Lichtperiode und in der Mitte der Dunkelperiode geerntet und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. 15 Hieraus wurde polyA⁺-RNA isoliert und ausgehend hiervon eine cDNA-Bibliothek im Vektor LambdaZAPII angelegt

Zum anderen wurde die isolierte RNA für eine RT-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (RACE; Schaefer, B.C. (1995) *Anal. Biochem.* 227, 255-273) eingesetzt. Als Primer für die erste RACE Reaktion wurden das 20 erste spezifische Oligonukleotid in Kombination mit einen "anchor(dT)15" Primer benutzt. Die erhaltenen Produkte wurden einer zweiten PCR unterzogen, wobei hier die jeweiligen "nested" Primer eingesetzt wurden. Es konnte ein spezifisches PCR-Fragment (300 bp) erhalten werden.

25 Ca. 300.000 Klone der cDNA-Bibliothek wurden mit diesem PCR-Fragment sondiert (siehe Ausführungsbeispiel 1). Positiv reagierende Klone wurden nach Standardverfahren gereinigt und nach Präparation der amplifizierten Phagen-DNA aus den gereinigten Plaques wurde durch *Eco*RI-Restriktionsverdau die Insertion kodierend für den Glukose 30 -Translokator erhalten und durch Southern-Blot Analyse, mit dem oben erwähnten PCR-Fragment als Sonde, verifiziert. Nach *in vivo* Excision des Phagemids aus dem Phagen mit Hilfe des filamentösen Helfer-Phagen ExAssist wurden die Klone durch Bestimmung der DNA-Sequenz analysiert (Dideoxymethode: Sanger et al., 1977, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) und aus dieser DNA-Sequenz die Primärstruktur des Glukose-Translokators abgeleitet (Klon pBSC-E43-30/3). Die Sequenz des Peptids konnte in der Gesamtsequenz des Translokators wiedergefunden werden. Die cDNA aus Spinat wurde 5 anschließend benutzt, um die entsprechenden cDNA Klone aus Geweben von *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* (Mais), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Nicotiana tabacum* (Tabak) mittels Durchmusterung der entsprechenden cDNA-Bibliotheken mit niedriger Stringenz zu isolieren.

10

Ausführungsbeispiel 3

Adressierung des Glukose-Translokator Vorstufenproteins zu den Chloroplasten und energieabhängige Insertion des reifen Proteins in die innere Hüllmembran.

15 Die *in vitro* Transkription des Plasmids pBSC-E43-30/3 wurde unter Verwendung von T7 RNA-Polymerase nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia) durchgeführt. Die anschließende *in vitro* Translation erfolgte im Retikulozyten-Lysat (Boehringer-Mannheim) und der postribosomale Überstand wurde für Proteintransporte in intakte 20 Spinat-Chloroplasten benutzt. Das Experiment wurde im Dunkeln bzw. im Licht durchgeführt; der Ansatz enthielt Import-Puffer (Flügge et al., 1989, EMBO J. 8: 39-46) und intakte Spinat-Chloroplasten (entsprechend 200 µg Chlorophyll). Nach 30 min bei 25 °C wurde die Chloroplasten gewaschen und die Hüllmembranen isoliert (Flügge et al., 25 1989, EMBO J. 8: 39-46). Sie wurden über eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970, Nature 227: 680-685) und anschließende Fluorographie (Bonner und Laskey, 1974, Eur. J. Biochem. 46: 84-88) analysiert. Es zeigte sich, daß die Präsequenz des Glukose-Translokators das anhängende reife Protein korrekt zu seiner 30 Zielmembran, der inneren Chloroplasten-Hüllmembran dirigiert; sie wird während des Import-Prozesses durch eine spezifische Protease abgespalten und das reife Protein entsteht. Im Dunkeln konnte die Insertion des Translokators durch die Zugabe von ATP energetisiert werden während in Abwesenheit von ATP wird kein Import beobachtet 35 wurde. Im Licht konnte die Energie für den Import des Proteins in Form von ATP über die photosynthetische Phosphorylierung bereitgestellt

werden; der Import war unter diesen Bedingungen unabhängig von zugegebenem ATP. Wurde die photosynthetische Phosphorylierung und die damit verbundene Produktion von ATP durch die Zugabe eines Entkopplers wie CCCP jedoch verhindert, war auch der Proteinimport 5 blockiert. Es zeigte sich ferner, daß das reife Protein protease-resistant in die innere Hüllmembran inseriert wurde: Zugabe von Proteasen (z.B. Thermolysin), die die äußere Hüllmembran nicht permeieren können, vermögen das in die innere Membran eingebaute reife Protein nicht anzugreifen. Eine Vorbehandlung der Chloroplasten mit einer Protease 10 (z.B. Thermolysin) führte zu einen völligen Verlust der Bindung und des Importes des Translokators was zeigte, daß die Präsequenz ("Targeting"-Sequenz) des Translokators in einem ersten Schritt zunächst spezifisch an Rezeptoren der äußeren Membran gebunden werden muß. Erst dann können dann die weiteren Schritte der Protein- 15 Insertion erfolgen.

Ausführungsbeispiel 4

*Expression des Glukose-Translokators aus Spinat in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe**

20 Für die Expression des Glukose-Translokators in Hefe wurde zuerst mittels PCR mit einem Oligonukleotid, welches an der Schnittstelle von Präsequenz und reifem Protein liegt, das entsprechende Fragment hergestellt. Das so erhaltene Fragment wurde in den Hefe-Expressionsvektor pEVP11 eingesetzt und nach Amplifikation des 25 Konstrukts in *E. coli* in durch LiCl/PEG kompetent gemachte (Ito et al., 1983, J. Bact. 153: 163-168) Leucinsynthese-defiziente *S. pombe* Zellen transformiert (Fischer et al., 1997, Plant Cell, 9: 453-462; (Kammerer et al., 1998, Plant Cell 10: 105-117) Transformanden wurden durch Selektion auf Minimalmedium ohne Leucin selektiert, da das pEVP11- 30 E43-30/3 Konstrukt den Hefezellen die Fähigkeit zum Wachstum auf leucinfreiem Medium verleiht.

Ausführungsbeispiel 5

Transformation von Pflanzen mit einer Konstruktion zur Überexpression der Kodierregion des Glukose-Translokators

Aus dem Phagemid pBluescript-E43-30/3 (pBSC-E43-30/3), der als Insertion die cDNA für den Glukose-Translokator aus Spinat enthielt 5 (siehe Ausführungsbeispiel 2) wurde die Insertion durch Restriktionsverdau isoliert und in den Vektor pBinAR (Höfgen and Willmitzer, 1990, Plant Sci. 66: 221-230) gerichtet kloniert. Nach Amplifikation des resultierenden Konstrukts pBinAR-E43-30/3 in *E. coli* wurden das Konstrukt in Agrobakterien transformiert und diese dann zur 10 Infektion von Blattsegmenten von Tabak und Kartoffel eingesetzt.

Die erhaltenen Transformanden wurden mit Hilfe von Southern-Blot Analysen auf die Präsenz des intakten, nicht rearrangierten chimären Gens untersucht. Die Glukose-Transportaktivität wurde im Vergleich zu Kontrolltransformanden (transformiert mit Vektor pBinAR ohne Insertion) 15 untersucht, ebenso das C/N-Verhältnis, Photosyntheserate, Stärkegehalt und Wachstum.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, die die Kodierregion eines plastidären Glukose-Translokators enthalten und die im Anhang dargestellten Nukleotidabfolgen aufweisen, wobei die Sequenzprotokolle Bestandteile des Anspruches sind, sowie Teile oder Derivate dieser DNA-Sequenzen, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen DNA-Sequenzen abgeleitet sind und für ein plastidäres Protein kodieren, das die biologische Aktivität eines Glukose-Translokators besitzt, und weitere DNA-Sequenzen, die mit diesen DNA-Sequenzen oder deren Teilen oder Derivaten hybridisieren.
2. Plasmide und Phagemide enthaltend eine DNA-Sequenz oder ein Teil oder Derivat der DNA-Sequenzen oder eine weitere DNA-Sequenz nach Anspruch 1.
- 15 3. Phagemid pBSC-E43/30-3 gemäß Anspruch 2 hinterlegt unter der DSM-Nummer DSM 12243 als *E. coli* Stamm DH5 α pBSC-E43/30-3 enthaltend dieses Phagemid.
4. Phagemid pBSC-Zm-pGT gemäß Anspruch 2 hinterlegt unter der DSM-Nummer DSM 12862 als *E. coli* Stamm SOLR pBSC-Zm-pGT 20 enthaltend dieses Phagemid.
5. Phagemid pBSC-St-pGT gemäß Anspruch 2 hinterlegt unter der DSM-Nummer DSM 12863 als *E. coli* Stamm DH5 α pBSC-St-pGT enthaltend dieses Phagemid.
6. Bakterien, enthaltend eine DNA-Sequenz oder einen Teil oder ein Derivat der DNA-Sequenzen oder eine weitere DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Plasmid/Phagemid gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5.

7. Hefen, enthaltend eine DNA-Sequenz oder einen Teil oder ein Derivat der DNA-Sequenzen oder eine weitere DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Plasmid gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5.
- 5 8. Pflanzenzellen enthaltend ein Plasmid gemäß Anspruch 2.
9. Transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierte transgene Pflanzen enthaltend eine DNA-Sequenz oder eine Teil oder ein Derivat der DNA-Sequenzen oder eine weitere DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1, wobei diese DNA-Sequenz oder 10 dieser Teil oder das Derivat davon oder die weitere DNA-Sequenz als Bestandteil eines rekombinaten DNA-Moleküls in die Pflanzenzellen eingeführt wurden.
10. Verwendung der DNA-Sequenzen oder Teile oder Derivate dieser DNA-Sequenzen oder der weiteren DNA-Sequenzen gemäß 15 Anspruch 1
 - a) zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenzen gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft sind und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese eines Glukose-Translokators bewirkt, führen,
 - b) zur Identifizierung von Insertionsmutanten, zur homologen Rekombination oder zur Expression einer nicht translatierbaren RNA, die mittels eines "anti-sense"-Effektes, einer Kosuppression oder einer Ribozymaktivität die Synthese eines oder mehrerer 20 endogener plastidärer Glukose-Translokatoren in den Zellen verhindert,
 - c) zur Veränderung des Kohlenstoff-/Stickstoff-Verhältnisses in Blättern bzw. in heterotrophen Geweben insbesondere zur Erhöhung des Stärkegehaltes,
 - 25 d) zur Erniedrigung der Bildung von Zuckern während der

Stärkemobilisierung,

- e) zur Isolierung von DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, das die biologische Aktivität eines Glukose-Translokators besitzt,
- 5 f) die als "targeting"-Sequenzen dienen, um mit Hilfe dieser Sequenzen prokaryontische oder eukaryontische Proteine, insbesondere Enzyme oder Proteine, die den aktiven oder passiven Transport von Metaboliten über Membranen katalysieren, in die Plastidenhüllmembran, in das Plastidenstroma oder in die
- 10 Thylakoide zu dirigieren,
- g) wobei diese Sequenzen kodierende Regionen enthalten, die für ein reifes Protein mit der biologischen Aktivität eines Glukose-Translokators kodieren, zur Kombination mit "targeting"-Sequenzen für andere Zellkompartimente oder zelluläre Membransysteme,
- 15 wodurch das reife Protein in andere Kompartimente oder Membransysteme dirigiert wird,
- h) zur Identifizierung von Substanzen, die eine inhibierende Wirkung auf den Transport von Hexosen über die innere Plastidenhüllmembran haben und/oder
- 20 i) zur Isolierung entsprechender genomischer Klone, insbesondere die Nutzung der entsprechenden Promotorbereiche oder von Promotorteilbereichen zur gewebespezifischen Expression von Genen.

SEQUENZPROTOKOLLE

5 <110> Prof. Dr. Flügge, Ulf-Ingo

<120> DNA-Sequenz, kodierend einen Glukose-Translokator,
10

Plasmide, Bakterien, Hefen und Pflanzen enthaltend

diesen Transporter

15

<130> plastidic glucose transporters

<140>

20 <141>

<150> 5652952

<151> 1999-06-13

25 <160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

30 <211> 1874

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

35 <221> CDS

<222> (2)..(1630)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1631)..(1874)

<400> 1

5 g gca cga gag atg atg cgc tgc gct gca acg ggc ggc ggg tgc gtc gct 49
Ala Arg Glu Met Met Arg Cys Ala Ala Thr Gly Gly Gly Cys Val Ala
1 5 10 15

tcg tgg agc ggc gat cgg aga ttg ccg gcg gtc aac ccc tgc agc gtg 97
10 Ser Trp Ser Gly Asp Arg Arg Leu Pro Ala Val Asn Pro Cys Ser Val
20 25 30

cgg atg ccg acg ggc aac gat ggg tgg tgc gcc ggc ctg agg tcg cgg 145
Arg Met Pro Thr Gly Asn Asp Gly Trp Cys Ala Gly Leu Arg Ser Arg
15 35 40 45

gcg gcg gat ctc gcc ggc ctc gag atg gcc aac ctg cgc ggc ggc gtc 193
Ala Ala Asp Leu Ala Gly Leu Glu Met Ala Asn Leu Arg Gly Gly Val
50 55 60

20 ggg ggg ctc ttc cgc gcg agc ccg cgc tac ggg cgc ttg caa gcc acg 241
Gly Gly Leu Phe Arg Ala Ser Pro Arg Tyr Gly Arg Leu Gln Ala Thr
65 70 75 80

25 gcg gca gtt gac cct gaa gat att cca ttg gag aag gtt caa gtt aaa 289
Ala Ala Val Asp Pro Glu Asp Ile Pro Leu Glu Lys Val Gln Val Lys
85 90 95

tcc tca gga cat gtt ctg cca tat gtt ggc gtt gct tgt ttg ggg gct 337
30 Ser Ser Gly His Val Leu Pro Tyr Val Gly Val Ala Cys Leu Gly Ala
100 105 110

att ctg ttt ggt tac cat ctt ggt gtg gtc aat ggc gca ctt gaa tat 385
Ile Leu Phe Gly Tyr His Leu Gly Val Val Asn Gly Ala Leu Glu Tyr
35 115 120 125

ctc gcg aag gat ctt ggg att gct gaa aat gct gtc ttg cag ggg tgg 433
Leu Ala Lys Asp Leu Gly Ile Ala Glu Asn Ala Val Leu Gln Gly Trp

130	135	140	
gtg gtt agc aca tcc ttg gct ggt gca aca cta ggt tct ttt act ggg 481			
Val	Val	Ser	Thr
5 145	150	155	160
Val Ala Gly Ala Thr Leu Gly Ser Phe Thr Gly			
ggt tct ttg gca gat aaa ttt ggg cgg aca aga aca ttc atc ctg gat 529			
Gly	Ser	Leu	Ala
Asp	Lys	Phe	Gly
165	170	175	
Arg Thr Arg Thr Phe Ile Leu Asp			
10			
gca gtc cca ctt gct cta ggt gca ttc ttg agt gca aca gct caa gat 577			
Ala	Val	Pro	Leu
Leu	Ala	Gly	Ala
Phe	Leu	Ser	Ala
180	185	190	
Thr	Ala	Gln	Asp
15 195	200	205	
atc cgc aca atg att att ggc cga ttg ctt gct gga att ggt atc ggg 625			
Ile	Arg	Thr	Met
Ile	Ile	Gly	Arg
Leu	Leu	Ala	Gly
Ile	Gly	Ile	Gly
210	215	220	
gtc tca tct gct ctt gta ccc ctt tac ata tct gag atc tca cca act 673			
20 Val	Ser	Ser	Ala
Leu	Val	Pro	Leu
Tyr	Ile	Ser	Glu
Ile	Ser	Pro	Thr
225	230	235	240
gaa att cgt gga aca ctt ggt acc gtt aat caa ctt ttt att tgc att 721			
Glu	Ile	Arg	Gly
Thr	Leu	Gly	Thr
Val	Asn	Gln	Leu
Phe	Ile	Cys	Ile
25 225	230	235	240
gga att ctt gca gct ttg tta gct gga ttg cct ctg gca gga aat cct 769			
Gly	Ile	Leu	Ala
Ala	Leu	Leu	Ala
Gly	Leu	Pro	Leu
Ala	Gly	Asn	Pro
245	250	255	
30			
gcc tgg tgg agg aca atg ttt gga att gct gta gtt cca tcc att ctg 817			
Ala	Trp	Trp	Arg
Trp	Arg	Thr	Met
Arg	Phe	Gly	Ile
Ile	Ala	Val	Val
Pro	Ser	Ile	Leu
260	265	270	
35 275	280	285	
ctg	gct	gta	gga
atg	gcc	ttt	tcg
gaa	cct	cgt	tgg
agc	ttt	ttt	ttc
280	285		
Leu	Ala	Val	Gly
Gly	Met	Ala	Phe
Ser	Pro	Glu	Ser
Pro	Arg	Trp	Leu
Phe			

cag caa gga aag gtt act caa gca gaa tta gct gta aaa aga ctg tat 913
Gln Gln Gly Lys Val Thr Gln Ala Glu Leu Ala Val Lys Arg Leu Tyr
290 295 300

5 gga aaa gaa atg gtt acc gaa att atg ttt gat ctg aga gct agt ggc 961
Gly Lys Glu Met Val Thr Glu Ile Met Phe Asp Leu Arg Ala Ser Gly
305 310 315 320

caa agt tct tcg gag tcc gaa gcc ggc tgg ttt gat ctt ttc agc aag 1009
10 Gln Ser Ser Ser Glu Ser Glu Ala Gly Trp Phe Asp Leu Phe Ser Lys
325 330 335

cgt tac tgg aaa gtt gtg agt gtg ggg gca gca ctg ttt ttg ttc cag 1057
Arg Tyr Trp Lys Val Val Ser Val Gly Ala Ala Leu Phe Leu Phe Gln
15 340 345 350

cag ctt gct ggt ata aac gct gtt gta tat tac tct aca tcg gtg ttc 1105
Gln Leu Ala Gly Ile Asn Ala Val Val Tyr Tyr Ser Thr Ser Val Phe
355 360 365

20 cgt agt gca ggc att gca tct gat gtt gct gct agt gct ctt gtt gga 1153
Arg Ser Ala Gly Ile Ala Ser Asp Val Ala Ala Ser Ala Leu Val Gly
370 375 380

25 gca gcc aat gtt ttt ggt act atg gtt gca tct tct cta atg gac aaa 1201
Ala Ala Asn Val Phe Gly Thr Met Val Ala Ser Ser Leu Met Asp Lys
385 390 395 400

caa gga agg aaa agc ctt ctg ata aca agc ttt tct gga atg ggt gct 1249
30 Gln Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Thr Ser Phe Ser Gly Met Gly Ala
405 410 415

tca atg cta ctc cta gca ttg tcc ttc acc tgg aaa gct ctg gca cct 1297
Ser Met Leu Leu Ala Leu Ser Phe Thr Trp Lys Ala Leu Ala Pro
35 420 425 430

tat tct ggt act ctt gct gtt ggc act gtt ctg tac gtg ctg tca 1345
Tyr Ser Gly Thr Leu Ala Val Val Gly Thr Val Leu Tyr Val Leu Ser

435

440

445

ttt gct cta gga gcg ggc cct gtt cca gcg cta ctt ctt cct gaa ata 1393
Phe Ala Leu Gly Ala Gly Pro Val Pro Ala Leu Leu Leu Pro Glu Ile

5 450

455

460

ttt gcc tcg aga ata agg gcc aag gct gtc gca tta tct cta ggc atg 1441
Phe Ala Ser Arg Ile Arg Ala Lys Ala Val Ala Leu Ser Leu Gly Met
465 470 475 480

10

cac tgg gta tct aac ttt ttc att ggc ctg tac ttc ctg agt gtc gtg 1489
His Trp Val Ser Asn Phe Phe Ile Gly Leu Tyr Phe Leu Ser Val Val
485 490 495

15 agc aag ttt ggg atc agc aac gtg tat ctg gga ttt gca tca gta tgt 1537
Ser Lys Phe Gly Ile Ser Asn Val Tyr Leu Gly Phe Ala Ser Val Cys
500 505 510

gcc ctt gca gtt ctg tac ata gct ggg aat gtg gtc gag acc aag ggg 1585
20 Ala Leu Ala Val Leu Tyr Ile Ala Gly Asn Val Val Glu Thr Lys Gly
515 520 525

aga tca ctt gaa gag att gaa agg gag cta agt gta gca gaa tga 1630
Arg Ser Leu Glu Glu Ile Glu Arg Glu Leu Ser Val Ala Glu
25 530 535 540

tgtacttttgcctagtcatgcgtggcgccgtttgggttatcgagaatgcaccaggcgct 1690
caaccgagca tccttggacc tggagactct ttcttagtttc atgttagttt agaaataagc 1750
30 gaacggcaag agtaccaatcttagtgact tgggtgtgggttgtgtctgaaataagtgaat 1810
tggattttagaaatttcagaaataagtgaattggattttagaaatttcaaaaaaaaaaaaaa 1870
35 aaaa 1874

<211> 542

<212> PRT

<213> Zea mays

5 <400> 2Ala Arg Glu Met Met Arg Cys Ala Ala Thr Gly Gly Gly Cys Val Ala
1 5 10 15Ser Trp Ser Gly Asp Arg Arg Leu Pro Ala Val Asn Pro Cys Ser Val
10 20 25 30Arg Met Pro Thr Gly Asn Asp Gly Trp Cys Ala Gly Leu Arg Ser Arg
35 40 45**15** Ala Ala Asp Leu Ala Gly Leu Glu Met Ala Asn Leu Arg Gly Gly Val
50 55 60Gly Gly Leu Phe Arg Ala Ser Pro Arg Tyr Gly Arg Leu Gln Ala Thr
65 70 75 80**20**
Ala Ala Val Asp Pro Glu Asp Ile Pro Leu Glu Lys Val Gln Val Lys
85 90 95Ser Ser Gly His Val Leu Pro Tyr Val Gly Val Ala Cys Leu Gly Ala
25 100 105 110Ile Leu Phe Gly Tyr His Leu Gly Val Val Asn Gly Ala Leu Glu Tyr
115 120 125**30** Leu Ala Lys Asp Leu Gly Ile Ala Glu Asn Ala Val Leu Gln Gly Trp
130 135 140Val Val Ser Thr Ser Leu Ala Gly Ala Thr Leu Gly Ser Phe Thr Gly
145 150 155 160**35**
Gly Ser Leu Ala Asp Lys Phe Gly Arg Thr Arg Thr Phe Ile Leu Asp
165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Leu Gly Ala Phe Leu Ser Ala Thr Ala Gln Asp
180 185 190

Ile Arg Thr Met Ile Ile Gly Arg Leu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Gly
5 195 200 205

Val Ser Ser Ala Leu Val Pro Leu Tyr Ile Ser Glu Ile Ser Pro Thr
210 215 220

10 Glu Ile Arg Gly Thr Leu Gly Thr Val Asn Gln Leu Phe Ile Cys Ile
225 230 235 240

Gly Ile Leu Ala Ala Leu Leu Ala Gly Leu Pro Leu Ala Gly Asn Pro
245 250 255

15 Ala Trp Trp Arg Thr Met Phe Gly Ile Ala Val Val Pro Ser Ile Leu
260 265 270

Leu Ala Val Gly Met Ala Phe Ser Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Phe
20 275 280 285

Gln Gln Gly Lys Val Thr Gln Ala Glu Leu Ala Val Lys Arg Leu Tyr
290 295 300

25 Gly Lys Glu Met Val Thr Glu Ile Met Phe Asp Leu Arg Ala Ser Gly
305 310 315 320

Gln Ser Ser Ser Glu Ser Glu Ala Gly Trp Phe Asp Leu Phe Ser Lys
325 330 335

30 Arg Tyr Trp Lys Val Val Ser Val Gly Ala Ala Leu Phe Leu Phe Gln
340 345 350

Gln Leu Ala Gly Ile Asn Ala Val Val Tyr Tyr Ser Thr Ser Val Phe
35 355 360 365

Arg Ser Ala Gly Ile Ala Ser Asp Val Ala Ala Ser Ala Leu Val Gly
370 375 380

Ala Ala Asn Val Phe Gly Thr Met Val Ala Ser Ser Leu Met Asp Lys
385 390 395 400

5 Gln Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Thr Ser Phe Ser Gly Met Gly Ala
405 410 415

Ser Met Leu Leu Ala Leu Ser Phe Thr Trp Lys Ala Leu Ala Pro
420 425 430

10 Tyr Ser Gly Thr Leu Ala Val Val Gly Thr Val Leu Tyr Val Leu Ser
435 440 445

Phe Ala Leu Gly Ala Gly Pro Val Pro Ala Leu Leu Leu Pro Glu Ile
15 450 455 460

Phe Ala Ser Arg Ile Arg Ala Lys Ala Val Ala Leu Ser Leu Gly Met
465 470 475 480

20 His Trp Val Ser Asn Phe Phe Ile Gly Leu Tyr Phe Leu Ser Val Val
485 490 495

Ser Lys Phe Gly Ile Ser Asn Val Tyr Leu Gly Phe Ala Ser Val Cys
500 505 510

25 Ala Leu Ala Val Leu Tyr Ile Ala Gly Asn Val Val Glu Thr Lys Gly
515 520 525

Arg Ser Leu Glu Glu Ile Glu Arg Glu Leu Ser Val Ala Glu
30 530 535 540

<210> 3

35 <211> 1653

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1419)

5 <220>

<221> 3'UTR

<222> (1420)..(1653)

<400> 3

10 ggc cgc tgc aga tca cac aga gtt cga gct gct gga gag gat att gag 48

Gly Arg Cys Arg Ser His Arg Val Arg Ala Ala Gly Glu Asp Ile Glu

1

5

10

15

gat gca gca cct ctc aaa gtt caa ggc caa tca tct gga tca gta ctt 96

15 Asp Ala Ala Pro Leu Lys Val Gln Gly Gln Ser Ser Gly Ser Val Leu

20

25

30

ccc tat gtg ggt gta gct tgt ctg gga gca att tta ttt gga tat cac 144

Pro Tyr Val Gly Val Ala Cys Leu Gly Ala Ile Leu Phe Gly Tyr His

20 35 40 45

cta ggg gtg gtg aat ggt gcc ctt gag tac cta gct aag gat ctt gga 192

Leu Gly Val Val Asn Gly Ala Leu Glu Tyr Leu Ala Lys Asp Leu Gly

50

55

60

25

att gcc gag aac act gtt ata caa gga tgg att gtt agc aca gtt ctt 240

Ile Ala Glu Asn Thr Val Ile Gln Gly Trp Ile Val Ser Thr Val Leu

65 70 75 80

30 gct ggc gcc ttt gtt ggt tca ttt act ggt gga gtt ctg gct gat aaa 288

Ala Gly Ala Phe Val Gly Ser Phe Thr Gly Gly Val Leu Ala Asp Lys

85

90

95

ttt ggc cga aca aag aca ttt ata ttg gat gca att cca ctt tca gtt 336

35 Phe Gly Arg Thr Lys Thr Phe Ile Leu Asp Ala Ile Pro Leu Ser Val

100

105

110

ggt gcg ttt cta tgt acc act gcc cag agt gtt cag gct atg atc att 384

Gly Ala Phe Leu Cys Thr Thr Ala Gln Ser Val Gln Ala Met Ile Ile
115 120 125

gga cgc tta ctt act gga att ggc att ggc atc tca tct gct att gtg 432
5 Gly Arg Leu Leu Thr Gly Ile Gly Ile Ser Ser Ala Ile Val
130 135 140

cca ctt tac ata tct gag atc tca ccc act gaa att cgc ggc aca ctg 480
Pro Leu Tyr Ile Ser Glu Ile Ser Pro Thr Glu Ile Arg Gly Thr Leu
10 145 150 155 160

gga acg gtc aat cag cta ttc att tgc att gga att ctt gtt gca ctc 528
Gly Thr Val Asn Gln Leu Phe Ile Cys Ile Gly Ile Leu Val Ala Leu
165 170 175

15

gtg gtt gga ttg cct ttg tct gga aat cct tcg tgg tgg aga aca atg 576
Val Val Gly Leu Pro Leu Ser Gly Asn Pro Ser Trp Trp Arg Thr Met
180 185 190

20 ttt ggt ctc gca ctt att cca tct gtt tta ctt gca ata gga atg gca 624
Phe Gly Leu Ala Leu Ile Pro Ser Val Leu Leu Ala Ile Gly Met Ala
195 200 205

ttt tct cct gaa agt cct cgg tgg ctc tat cag caa ggg aga att tct 672
25 Phe Ser Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Tyr Gln Gln Gly Arg Ile Ser
210 215 220

gaa gct gag aca tct att aaa agg cta tat ggt aaa gaa aaa gtt gct 720
Glu Ala Glu Thr Ser Ile Lys Arg Leu Tyr Gly Lys Glu Lys Val Ala
30 225 230 235 240

gag gtt atg ggt gac ttg gaa gct tct gcc cgg ggt tct tca gaa cca 768
Glu Val Met Gly Asp Leu Glu Ala Ser Ala Arg Gly Ser Ser Glu Pro
245 250 255

35

gat gct ggg tgg ctt gat cta ttt agt agc cgt tat agg aaa gtt gtt 816
Asp Ala Gly Trp Leu Asp Leu Phe Ser Ser Arg Tyr Arg Lys Val Val
260 265 270

agc att ggt gca gct atg ttc ttg ttg cag cag ttg gct ggg ata aat	864	
Ser Ile Gly Ala Ala Met Phe Leu Leu Gln Gln Leu Ala Gly Ile Asn		
275	280	285
5		
gct gtt gtc tat tat tcc act gcc gtg ttc cgg agt gct gga att aca	912	
Ala Val Val Tyr Tyr Ser Thr Ala Val Phe Arg Ser Ala Gly Ile Thr		
290	295	300
10		
tct gat gta gca gcc agt gct ctg gtt gga gca gcc aac gtc ttt ggg	960	
Ser Asp Val Ala Ala Ser Ala Leu Val Gly Ala Ala Asn Val Phe Gly		
305	310	315
320		
15		
aca acg gtg gca tcc tct ttg atg gac aaa caa gga agg aag agt ctc	1008	
Thr Thr Val Ala Ser Ser Leu Met Asp Lys Gln Gly Arg Lys Ser Leu		
325	330	335
20		
ttg ctc ata agc tat act gga atg gct gca tca atg atg ttg ctt tcc	1056	
Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Gly Met Ala Ala Ser Met Met Leu Leu Ser		
340	345	350
25		
ttg tca ttc act tgg aag gtc ctg act cca tat tct ggc aca ctg gct	1104	
Leu Ser Phe Thr Trp Lys Val Leu Thr Pro Tyr Ser Gly Thr Leu Ala		
355	360	365
30		
cct gtg cct gct ctt cta ctt cca gaa ata ttt gct tcc aga att agg	1200	
Pro Val Pro Ala Leu Leu Pro Glu Ile Phe Ala Ser Arg Ile Arg		
385	390	395
400		
35		
gca aaa gcg gtg gct ctc tct ttg ggg gta cat tgg ata atg aac ttc	1248	
Ala Lys Ala Val Ala Leu Ser Leu Gly Val His Trp Ile Met Asn Phe		
405	410	415
40		
ttt att ggc ctg tac ttc ttg agc att gta act aaa ttt ggt atc agt	1296	

12

Phe Ile Gly Leu Tyr Phe Leu Ser Ile Val Thr Lys Phe Gly Ile Ser
420 425 430

acg gtg tac atg gga ttt gca ctc tct tgt ctt gtt gct gtc gtg tat 1344
5 Thr Val Tyr Met Gly Phe Ala Leu Ser Cys Leu Val Ala Val Val Tyr
435 440 445

ata act ggt aat gtc gtg gag aca aag ggg cgg tca ctg gag gag ata 1392
Ile Thr Gly Asn Val Val Glu Thr Lys Gly Arg Ser Leu Glu Glu Ile
10 450 455 460

gaa cgt gag tta agt cca gca att tga gtggtacaac atgaacagct 1439
Glu Arg Glu Leu Ser Pro Ala Ile
465 470

15
gagagtaatt tcagattccg ccatccagtg ggtcttgatt ttgaagagat tctccacatt 1499

gggagttcta ttattgcgag actggagttg catcacttac ccttagcta tctctttgat 1559

20 tttcttgta ctcggcatca tgaatcatgg aacattgtaa aaacatgtaa ctgttatgga 1619

agatgatccg cgtatgattg agtattcaa aaaa 1653

25 <210> 4
<211> 472
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

30 <400> 4
Gly Arg Cys Arg Ser His Arg Val Arg Ala Ala Gly Glu Asp Ile Glu
1 5 10 15

Asp Ala Ala Pro Leu Lys Val Gln Gly Gln Ser Ser Gly Ser Val Leu
35 20 25 30

Pro Tyr Val Gly Val Ala Cys Leu Gly Ala Ile Leu Phe Gly Tyr His
35 40 45

Leu Gly Val Val Asn Gly Ala Leu Glu Tyr Leu Ala Lys Asp Leu Gly
50 55 60

5 Ile Ala Glu Asn Thr Val Ile Gln Gly Trp Ile Val Ser Thr Val Leu
65 70 75 80

Ala Gly Ala Phe Val Gly Ser Phe Thr Gly Gly Val Leu Ala Asp Lys
85 90 95

10 Phe Gly Arg Thr Lys Thr Phe Ile Leu Asp Ala Ile Pro Leu Ser Val
100 105 110

Gly Ala Phe Leu Cys Thr Thr Ala Gln Ser Val Gln Ala Met Ile Ile
15 115 120 125

Gly Arg Leu Leu Thr Gly Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ser Ala Ile Val
130 135 140

20 Pro Leu Tyr Ile Ser Glu Ile Ser Pro Thr Glu Ile Arg Gly Thr Leu
145 150 155 160

Gly Thr Val Asn Gln Leu Phe Ile Cys Ile Gly Ile Leu Val Ala Leu
165 170 175

25 Val Val Gly Leu Pro Leu Ser Gly Asn Pro Ser Trp Trp Arg Thr Met
180 185 190

Phe Gly Leu Ala Leu Ile Pro Ser Val Leu Leu Ala Ile Gly Met Ala
30 195 200 205

Phe Ser Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Tyr Gln Gln Gly Arg Ile Ser
210 215 220

35 Glu Ala Glu Thr Ser Ile Lys Arg Leu Tyr Gly Lys Glu Lys Val Ala
225 230 235 240

Glu Val Met Gly Asp Leu Glu Ala Ser Ala Arg Gly Ser Ser Glu Pro

245 250 255

Asp Ala Gly Trp Leu Asp Leu Phe Ser Ser Arg Tyr Arg Lys Val Val
260 265 270

5

Ser Ile Gly Ala Ala Met Phe Leu Leu Gln Gln Leu Ala Gly Ile Asn
275 280 285

Ala Val Val Tyr Tyr Ser Thr Ala Val Phe Arg Ser Ala Gly Ile Thr
10 290 295 300

Ser Asp Val Ala Ala Ser Ala Leu Val Gly Ala Ala Asn Val Phe Gly
305 310 315 320

15 Thr Thr Val Ala Ser Ser Leu Met Asp Lys Gln Gly Arg Lys Ser Leu
325 330 335

Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Gly Met Ala Ala Ser Met Met Leu Leu Ser
340 345 350

20

Leu Ser Phe Thr Trp Lys Val Leu Thr Pro Tyr Ser Gly Thr Leu Ala
355 360 365

Val Leu Gly Thr Val Leu Tyr Val Leu Ser Phe Ser Leu Gly Ala Gly
25 370 375 380

Pro Val Pro Ala Leu Leu Leu Pro Glu Ile Phe Ala Ser Arg Ile Arg
385 390 395 400

30 Ala Lys Ala Val Ala Leu Ser Leu Gly Val His Trp Ile Met Asn Phe
405 410 415

Phe Ile Gly Leu Tyr Phe Leu Ser Ile Val Thr Lys Phe Gly Ile Ser
420 425 430

35

Thr Val Tyr Met Gly Phe Ala Leu Ser Cys Leu Val Ala Val Val Tyr
435 440 445

Ile Thr Gly Asn Val Val Glu Thr Lys Gly Arg Ser Leu Glu Glu Ile
450 455 460

Glu Arg Glu Leu Ser Pro Ala Ile
5 465 470

<210> 5
10 <211> 1864
<212> DNA
<213> Spinacia oleracea

<220>
15 <221> CDS
<222> (61)..(1716)

<220>
<221> 5'UTR
20 <222> (1)..(60)

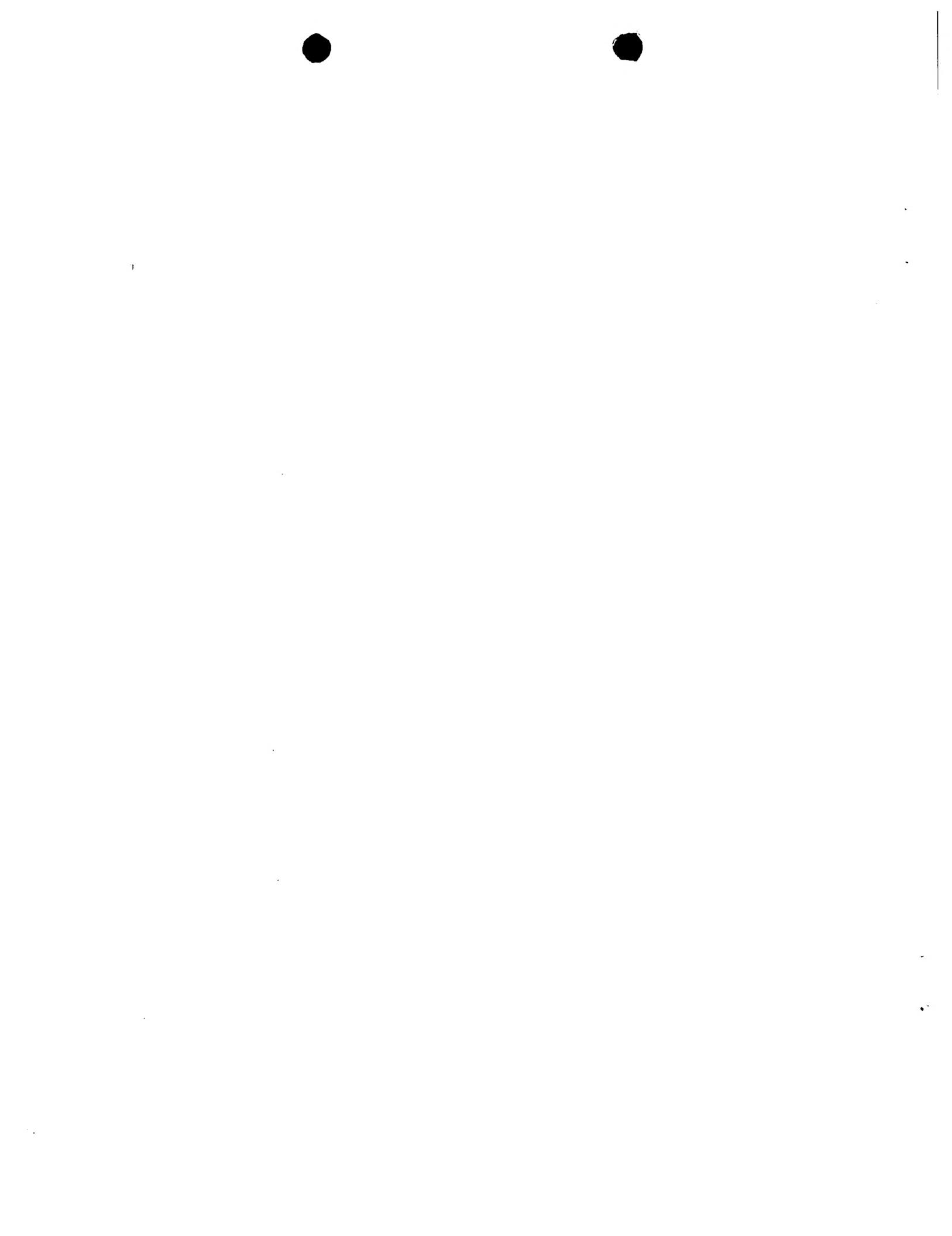
<220>
<221> 3'UTR
<222> (1717)..(1864)

25
<400> 5
ggcacgaggc gatcgctgct taatcaattt caactttcgg tttagaaaaa gagggggaaa 60
atg cag gcg tca act ttt atg gtc aaa ggc aat ttg ggt ttt gaa gtt 108

30 Met Gln Ala Ser Thr Phe Met Val Lys Gly Asn Leu Gly Phe Glu Val
1 5 10 15

cag aac cgt aga gtg gct ggg ctt gct ggg ttg aaa ggg tta agc tca 156
Gln Asn Arg Arg Val Ala Gly Leu Ala Gly Leu Lys Gly Leu Ser Ser
35 20 25 30

atc cgt tcc aat aat cta agt ttt gtg aat gtt aat gac aat aat tat 204
Ile Arg Ser Asn Asn Leu Ser Phe Val Asn Val Asp Asn Asn Tyr



35

40

45

aag tct aat ccc tgt aaa ttg agt tgt ggg tcc ctt tcg atg ggt gct 252
Lys Ser Asn Pro Cys Lys Leu Ser Cys Gly Ser Leu Ser Met Gly Ala
5 50 55 60

gga ttt gca aga ttg ggt ctt gat cat gtc atg aag tcc tca ccc aag 300
Gly Phe Ala Arg Leu Gly Leu Asp His Val Met Lys Ser Ser Pro Lys
65 70 75 80

10 tac aga tca gtc aag gct caa gct gct tct gga gga gat ctt gaa gat 348
Tyr Arg Ser Val Lys Ala Gln Ala Ala Ser Gly Gly Asp Leu Glu Asp
85 90 95

15 gcc act cct gtc aaa tat caa ggc aaa tct tct gca tca gtg ttg ccg 396
Ala Thr Pro Val Lys Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Ala Ser Val Leu Pro
100 105 110

20 tat gtt ggt gtt gct tgt ttg gga gct att ttg ttt gga tat cac ctt 444
Tyr Val Gly Val Ala Cys Leu Gly Ala Ile Leu Phe Gly Tyr His Leu
115 120 125

25 ggt gtg gta aat gga gct ctt gac tac cta tct gcg gat tta gct att 492
Gly Val Val Asn Gly Ala Leu Asp Tyr Leu Ser Ala Asp Leu Ala Ile
130 135 140

gct ggc aat act gtt tta caa gga tgg gtt gtg agc ata tta ctt gct 540
Ala Gly Asn Thr Val Leu Gln Gly Trp Val Val Ser Ile Leu Leu Ala
145 150 155 160

30 gga gcg act gta ggt tca ttt act ggc gga tct ttg gct gat aag ttt 588
Gly Ala Thr Val Gly Ser Phe Thr Gly Gly Ser Leu Ala Asp Lys Phe
165 170 175

35 gga agg aca aag acc ttc cag tta gat gca att cct ctt gca ata gga 636
Gly Arg Thr Lys Thr Phe Gln Leu Asp Ala Ile Pro Leu Ala Ile Gly
180 185 190

gct tat ctc tgt gcc aca gca caa aat gta cag ata atg atg att ggt	684
Ala Tyr Leu Cys Ala Thr Ala Gln Asn Val Gln Ile Met Met Ile Gly	
195 200 205	
5 cgt tta ctt tgt ggc att gga att ggc ata tca tct gcc tta gtt ccg	732
Arg Leu Leu Cys Gly Ile Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val Pro	
210 215 220	
10 tta tac att tct gag att tcg cca act gaa att cga ggt gca ctt ggt	780
Leu Tyr Ile Ser Glu Ile Ser Pro Thr Glu Ile Arg Gly Ala Leu Gly	
225 230 235 240	
15 tct gtc aac cag ctt ttt ata tgc att ggt att ctt gcg gct ttg gtt	828
Ser Val Asn Gln Leu Phe Ile Cys Ile Gly Ile Leu Ala Ala Leu Val	
245 250 255	
20 gct gga ttg cct tta gca gga aac cct ttg tgg tgg agg aca atg ttt	876
Ala Gly Leu Pro Leu Ala Gly Asn Pro Leu Trp Trp Arg Thr Met Phe	
260 265 270	
25 ggt att gca aca gtt ccc tct gtt ctc ttg gct ctt ggg atg ggc ttc	924
Gly Ile Ala Thr Val Pro Ser Val Leu Leu Ala Leu Gly Met Gly Phe	
275 280 285	
30 ttg cca gaa agc cct agg tgg ctt ttt cag caa gga aaa att gtt gaa	972
Cys Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Phe Gln Gln Gly Lys Ile Val Glu	
290 295 300	
35 gca gaa aag gcc gta gca gcc ctc tat gga aaa gaa agg gtt ccg gag	1020
Ala Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Tyr Gly Lys Glu Arg Val Pro Glu	
305 310 315 320	
35 gtg att aat gat ttg aga gca tct gtt caa ggt tct tct gaa cca gaa	1068
Val Ile Asn Asp Leu Arg Ala Ser Val Gln Gly Ser Ser Glu Pro Glu	
325 330 335	
40 gct ggc tgg ttt gat ctg ttc agt agc cgc tac agg aaa gtg gta agt	1116
Ala Gly Trp Phe Asp Leu Phe Ser Ser Arg Tyr Arg Lys Val Val Ser	

18

340

345

350

gtt ggt gct gca ctt ttc ttg ttc cag caa atg gca gga atc aat gct 1164
Val Gly Ala Ala Leu Phe Leu Phe Gln Gln Met Ala Gly Ile Asn Ala

5 355 360 365

gtt gta tat tac tcc aca tct gta ttc cga agt gct gga att gca tca 1212
Val Val Tyr Tyr Ser Thr Ser Val Phe Arg Ser Ala Gly Ile Ala Ser
370 375 380

10

gat gtt gcc gct agt gcc ctt gtt gga gca tca aat gtt att ggc act 1260
Asp Val Ala Ala Ser Ala Leu Val Gly Ala Ser Asn Val Ile Gly Thr
385 390 395 400

15 gct gtc gcc tct tct tta atg gac aag caa gga aga aag agc cta ctg 1308
Ala Val Ala Ser Ser Leu Met Asp Lys Gln Gly Arg Lys Ser Leu Leu
405 410 415

atg aca agt ttc tca gga atg gct gcc tca atg ttg ttg ctg tca cta 1356
20 Met Thr Ser Phe Ser Gly Met Ala Ala Ser Met Leu Leu Leu Ser Leu
420 425 430

tcg ttc aca tgg aag gct cta gca cct tac tcg ggc aca ctt gcc gtt 1404
Ser Phe Thr Trp Lys Ala Leu Ala Pro Tyr Ser Gly Thr Leu Ala Val
25 435 440 445

gtg gga act gtt tta tat gtc ctt tcc ttt tca ctt ggc gct ggt cct 1452
Val Gly Thr Val Leu Tyr Val Leu Ser Phe Ser Leu Gly Ala Gly Pro
450 455 460

30

gtt cct gct ctt cta ctt cca gag atc ttc gca tcc aga atc cga gca 1500
Val Pro Ala Leu Leu Pro Glu Ile Phe Ala Ser Arg Ile Arg Ala
465 470 475 480

35 aaa gca gtg gct ttg tca ctg gga atg cat tgg gcg tca aac ttc gta 1548
Lys Ala Val Ala Leu Ser Leu Gly Met His Trp Ala Ser Asn Phe Val
485 490 495

19

att ggc ctt tat ttc tta agt gtg gtg acc aag ttt gga atc agc aaa 1596
Ile Gly Leu Tyr Phe Leu Ser Val Val Thr Lys Phe Gly Ile Ser Lys
500 505 510

5 gtg tat ttg ggg ttc gcg tca gtg tgt gtg ctt gcc gtg ttg tac ata 1644
Val Tyr Leu Gly Phe Ala Ser Val Cys Val Leu Ala Val Leu Tyr Ile
515 520 525

10 gct ggt aac gtt gtt gaa aca aaa gga cga tca ctt gag gaa ata gag 1692
Ala Gly Asn Val Val Glu Thr Lys Gly Arg Ser Leu Glu Glu Ile Glu
530 535 540

15 ctt gct cta agt cca gct gtt tag ttggaggat acagttttc tggttttg 1746
Leu Ala Leu Ser Pro Ala Val
545 550

20 atctatagag aattatgtta ataattcccg gat taggag tttgatgcta gtttcatgc 1806

tcgttggcac attcatgtcc agacagttgt actatcaatg tcagaaattc ctcttgcc 1864
20

<210> 6
<211> 551
<212> PRT

25 <213> Spinacia oleracea

<400> 6
Met Gln Ala Ser Thr Phe Met Val Lys Gly Asn Leu Gly Phe Glu Val
1 5 10 15

30 Gln Asn Arg Arg Val Ala Gly Leu Ala Gly Leu Lys Gly Leu Ser Ser
20 25 30

Ile Arg Ser Asn Asn Leu Ser Phe Val Asn Val Asn Asp Asn Asn Tyr
35 35 40 45

Lys Ser Asn Pro Cys Lys Leu Ser Cys Gly Ser Leu Ser Met Gly Ala
50 55 60

Gly Phe Ala Arg Leu Gly Leu Asp His Val Met Lys Ser Ser Pro Lys
65 70 75 80

5 Tyr Arg Ser Val Lys Ala Gln Ala Ala Ser Gly Gly Asp Leu Glu Asp
85 90 95

Ala Thr Pro Val Lys Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Ala Ser Val Leu Pro
100 105 110

10 Tyr Val Gly Val Ala Cys Leu Gly Ala Ile Leu Phe Gly Tyr His Leu
115 120 125

Gly Val Val Asn Gly Ala Leu Asp Tyr Leu Ser Ala Asp Leu Ala Ile
15 130 135 140

Ala Gly Asn Thr Val Leu Gln Gly Trp Val Val Ser Ile Leu Leu Ala
145 150 155 160

20 Gly Ala Thr Val Gly Ser Phe Thr Gly Gly Ser Leu Ala Asp Lys Phe
165 170 175

Gly Arg Thr Lys Thr Phe Gln Leu Asp Ala Ile Pro Leu Ala Ile Gly
180 185 190

25 Ala Tyr Leu Cys Ala Thr Ala Gln Asn Val Gln Ile Met Met Ile Gly
195 200 205

Arg Leu Leu Cys Gly Ile Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val Pro
30 210 215 220

Leu Tyr Ile Ser Glu Ile Ser Pro Thr Glu Ile Arg Gly Ala Leu Gly
225 230 235 240

35 Ser Val Asn Gln Leu Phe Ile Cys Ile Gly Ile Leu Ala Ala Leu Val
245 250 255

Ala Gly Leu Pro Leu Ala Gly Asn Pro Leu Trp Trp Arg Thr Met Phe

21

260

265

270

Gly Ile Ala Thr Val Pro Ser Val Leu Leu Ala Leu Gly Met Gly Phe
275 280 285

5

Cys Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Phe Gln Gln Gly Lys Ile Val Glu
290 295 300

Ala Glu Lys Ala Val Ala Ala Leu Tyr Gly Lys Glu Arg Val Pro Glu
10 305 310 315 320

Val Ile Asn Asp Leu Arg Ala Ser Val Gln Gly Ser Ser Glu Pro Glu
325 330 335

15 Ala Gly Trp Phe Asp Leu Phe Ser Ser Arg Tyr Arg Lys Val Val Ser
340 345 350

Val Gly Ala Ala Leu Phe Leu Phe Gln Gln Met Ala Gly Ile Asn Ala
355 360 365

20

Val Val Tyr Tyr Ser Thr Ser Val Phe Arg Ser Ala Gly Ile Ala Ser
370 375 380

Asp Val Ala Ala Ser Ala Leu Val Gly Ala Ser Asn Val Ile Gly Thr
25 385 390 395 400

Ala Val Ala Ser Ser Leu Met Asp Lys Gln Gly Arg Lys Ser Leu Leu
405 410 415

30 Met Thr Ser Phe Ser Gly Met Ala Ala Ser Met Leu Leu Leu Ser Leu
420 425 430

Ser Phe Thr Trp Lys Ala Leu Ala Pro Tyr Ser Gly Thr Leu Ala Val
435 440 445

35

Val Gly Thr Val Leu Tyr Val Leu Ser Phe Ser Leu Gly Ala Gly Pro
450 455 460

Val Pro Ala Leu Leu Leu Pro Glu Ile Phe Ala Ser Arg Ile Arg Ala
465 470 475 480

Lys Ala Val Ala Leu Ser Leu Gly Met His Trp Ala Ser Asn Phe Val
5 485 490 495

Ile Gly Leu Tyr Phe Leu Ser Val Val Thr Lys Phe Gly Ile Ser Lys
500 505 510

10 Val Tyr Leu Gly Phe Ala Ser Val Cys Val Leu Ala Val Leu Tyr Ile
515 520 525

Ala Gly Asn Val Val Glu Thr Lys Gly Arg Ser Leu Glu Glu Ile Glu
530 535 540

15

Leu Ala Leu Ser Pro Ala Val
545 550

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/04095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/29 C12N1/19 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AF000952, 16 December 1997 (1997-12-16) MBEGUIE A, ET AL.: "Prunus armeniaca putative sugar transporter mRNA" XP002121555 abstract ---- DATABASE GENBANK 'Online! Accession number L01424, 12 April 1995 (1995-04-12) MATTHEAKIS LC, ET AL.: "Saccharomyces cerevisiae diptamide biosynthesis (DPH2) gene" XP002121556 abstract ----	1,2,6-10 1,2,6-9 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 1999

Date of mailing of the international search report

24/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EI 99/04095

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENBANK 'Online! Accession number Y10558, 20 January 1997 (1997-01-20) VESKE A: "C. familiaris rds gene" XP002121557 abstract ---	1,2,6-9
A	SERVAITES J, GEIGER D: "Studies on the Chloroplastic Glucose Translocator" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 111, no. 2, 1996, page S108 XP002121552 Rockville Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas, USA, 27.-31.07.1996 the whole document ---	
A	FLUEGGE U -I ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PLASTID TRANSPORTERS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 849-852, XP000674340 ISSN: 0764-4469 the whole document ---	
A	TRETHEWEY RN, APREES T: "The Role of the Hexose Transporter in the Chloroplasts of Arabidopsis thaliana L." PLANTA, vol. 195, no. 2, December 1994 (1994-12), pages 168-174, XP002121553 the whole document ---	
A	KAMMERER B, ET AL.: "Molecular Characterization of a Carbon Transporter in Plastids from Heterotrophic Tissue: The Glucose 6-Phosphate/Phosphate Antiporter" THE PLANT CELL, vol. 10, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 105-117, XP002121554 the whole document ---	

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/L 99/04095

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/29 C12N1/19 C12N5/10 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AF000952, 16. Dezember 1997 (1997-12-16) MBEGUIE A, ET AL.: "Prunus armeniaca putative sugar transporter mRNA" XP002121555 Zusammenfassung ----	1,2,6-10
X	DATABASE GENBANK 'Online! Accession number L01424, 12. April 1995 (1995-04-12) MATTHEAKIS LC, ET AL.: "Saccharomyces cerevisiae diptamide biosynthesis (DPH2) gene" XP002121556 Zusammenfassung ----	1,2,6-9 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

4. November 1999

24/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo rd.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

INTERNATIONALER FÄCHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/E 99/04095

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE GENBANK 'Online! Accession number Y10558, 20. Januar 1997 (1997-01-20) VESKE A: "C. familiaris rds gene" XP002121557 Zusammenfassung ---	1,2,6-9
A	SERVAITES J, GEIGER D: "Studies on the Chloroplastic Glucose Translocator" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 111, Nr. 2, 1996, Seite S108 XP002121552 Rockville Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas, USA, 27.-31.07.1996 das ganze Dokument ---	
A	FLUEGGE U -I ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PLASTID TRANSPORTERS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, Bd. 319, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 849-852, XP000674340 ISSN: 0764-4469 das ganze Dokument ---	
A	TRETHEWEY RN, APREES T: "The Role of the Hexose Transporter in the Chloroplasts of Arabidopsis thaliana L." PLANTA, Bd. 195, Nr. 2, Dezember 1994 (1994-12), Seiten 168-174, XP002121553 das ganze Dokument ---	
A	KAMMERER B, ET AL.: "Molecular Characterization of a Carbon Transporter in Plastids from Heterotrophic Tissue: The Glucose 6-Phosphate/Phosphate Antiporter" THE PLANT CELL, Bd. 10, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 105-117, XP002121554 das ganze Dokument -----	